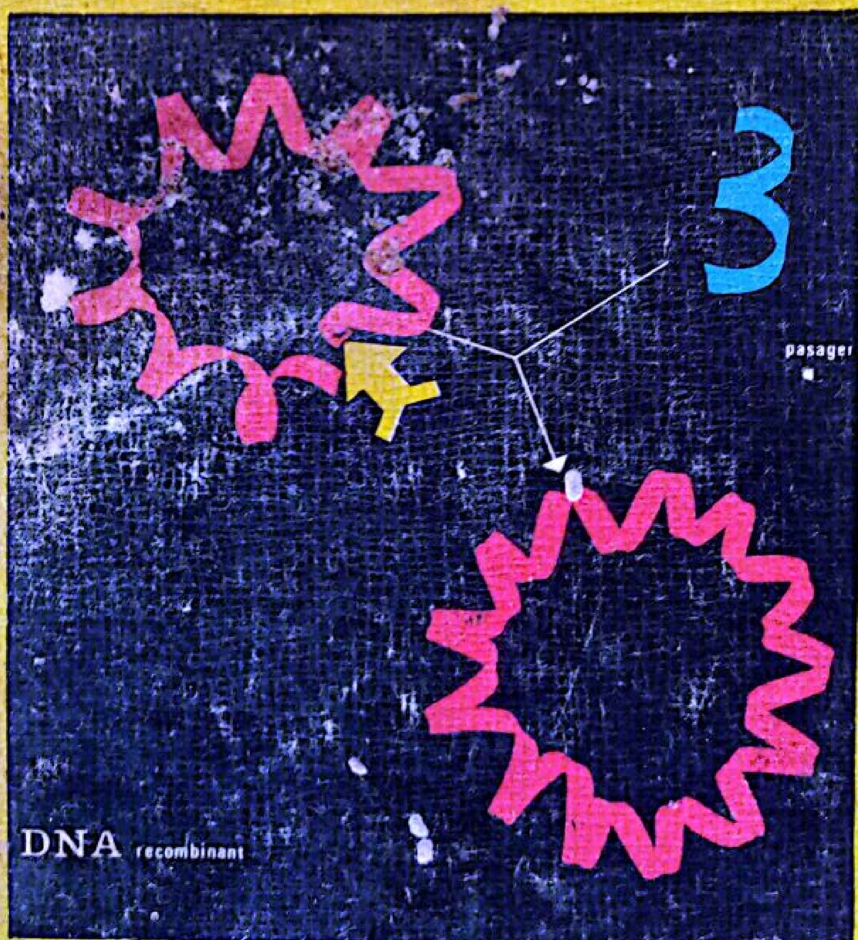
Liviu Popa · Rodica Repanovici

TEHNOLOGIA DNA RECOMBINANT

(INGINERIE GENETICĂ)



LIVIU M. POPA

RODICA REPANOVICI

TEHNOLOGIA DNA RECOMBINANT

(inginerie genetică)

prof. M. Pădureanu



Editura științifică și enciclopedică

București, 1982

Prefață

În urmă cu trei decenii nimeni nu și-ar fi închipuit că oamenii de știință vor cunoaște structura genelor și modul lor de a se exprima în diferite sisteme celulare, dar în nici un caz că vor fi în stare să proiecteze și să construiască gene. Contrar acestor păreri, într-o perioadă relativ scurtă de timp, s-a demonstrat fără tăgadă că moleculele de acid deoxiribonucleic și acid ribonucleic atît ale organismelor inferioare și superioare, cît și ale virusurilor sînt astfel organizate încît ele conțin în mod codificat informația genetică pentru sinteza proteinelor celulare și, respectiv virale; mai mult chiar, s-au descifrat în multe cazuri mecanismele intime care stau la baza complicatelor reacții prin care se elaborează o anumită proteină în organism, fenomene reproduse curînd în laborator. S-a realizat, de fapt, o adevărată revoluție în biologie, care fără îndoială a schimbat radical imaginea noastră despre procesele fundamentale biologice, progresele realizate fiind de-a dreptul fantastice. Pentru justificare, este suficient să ne referim chiar numai la posibilitatea pe care o avem azi de a oferi unei instalații proiectul sintezei unei gene prin operații automatizate, cu realizarea ei în aproximativ o săptămînă.

Ne găsim deci în plină eră a adevăratei „ingineriei genice" iar începutul ei poate fi confundat cu momentul apariției, în anul 1973, a tehnologiei DNA recombinant, tehnologie prin care s-a construit în laborator prima moleculă de DNA activă biologic, în care elementele genetice erau asamblate după dorința omului.

Cartea valoroșilor mei colaboratori din Institutul de virusologie „Ștefan S. Nicolau", dr. Liviu M. Popa și dr. Rodica Repanovici, prima de acest fel în literatura noastră științifică și după cunoștințele mele și în literatura științifică internațională (mai ales că ea a fost elaborată în cea mai mare parte în anul 1979), tratează cu competență tocmai bazele moleculare ale tehnologiei DNA recombinant.

Ea a fost astfel alcătuită încît să fie utilă atît pentru lămurirea unor aspecte teoretice, dar mai ales pentru a servi ca instrument practic de lucru în abordarea unor numeroase aspecte ale problemei.

Volumul, ce am cinstea să-l prefaţez, se adresează unui public larg format din specialişti în biologie, medicină, chimie, agricultură, fiind utilă — sînt convins — şi studenţilor din diferite facultăţi cu profil biologic sau tehnic.

Îmi exprim speranţa că această carte va da un imbold cercetărilor de inginerie genetică în ţara noastră şi va contribui la introducerea tehnologiei DNA recombinant în cît mai multe laboratoare şi chiar în industrie, în scopul dezvoltării pe plan ştiinţific şi economic a societăţii noastre care a plasat şi plasează ştiinţa la loc de frunte.

prof. dr. doc. **N. CAJAL**

Tabla de materii

Glosar 11
Introducere 15

I. Relația acizi nucleici-proteine (Generalități) 19

I.1. „O genă — un polipeptid" 21
I.2. Particularități întîlnite la eucariote 21
I.3. O genă generează mai multe proteine? 25
I.4. Mecanisme de reglare a sintezei proteinelor 27
I.4.1. *Reglarea sintezei proteinelor la procariote* 28
I.4.2. *Cîteva date privind transcrierea informației genetice* 29
I.4.3. *Semnificația unor secvențe de nucleotide din DNA* 30

Bibliografie 33

II. Tehnologia DNA recombinant 35

II.1. Schema generală a tehnologiei DNA recombinant 36
II.1.1. *Vehicul sau vector* 36
II.1.2. *Pasager* 36
II.1.3. *Deschiderea vehiculului* 37
II.1.4. *Formarea de capete coezive la vehicul sau/și pasager* 37
II.1.5. *Legarea pasagerului de vehicul* 38
II.1.6. *Poziția pasagerului în vehicul* 39
II.1.7. *Introducerea și exprimarea DNA recombinant în celule* 39
II.1.8. *Clonarea DNA recombinant* 41
II.1.9. *Identificarea chimică a DNA recombinant* 41
II.1.10. *Identificarea produsului sintetizat de DNA recombinant* 42

Bibliografie 44

III. Fenomenul de restricție și modificare 45

III.1. Caracteristicile generale ale sistemului de restricție și modificare 48
III.2. Rolul biologic major al restricției și modificării 49
III.3. Enzime de restricție 51
III.3.1. *Sisteme R-M de tip II* 53
III.3.2. *Sisteme R-M de tip I* 70
III.3.3. *Sisteme R-M de tip III* 78

Bibliografie 78

IV. DNA-ligazele 81
IV.1. Mecanismul de acțiune 82
IV.1.1. *Izolarea produșilor intermediari* 84
IV.1.2. *Desfășurarea reacției inverse* 87
IV.1.3. *Analiza cineticii stării staționare* 88
IV.2. Specificitatea de substrat a DNA-ligazelor 91
IV.3. Proprietățile fizico-chimice ale DNA-ligazelor 95
IV.3.1. *Masa moleculară* 95
IV.3.2. *Compoziția în aminoacizi și proprietățile spectrale* 95
IV.3.3. *Cofactori și ioni* 96
IV.3.4. *pH optim și stabilitate* 97
IV.3.5. *Temperatura optimă* 97
IV.4. Izolarea și purificarea DNA-ligazelor 98
IV.5. Testarea activității DNA-ligazice 100
IV.5.1. *Conversia DNA liniar la forma CCI* 102
IV.5.2. *Conversia DNA denaturat la forme renaturabile* 104
IV.5.3. *Conversia capetelor 5'—^{32}P-fosfomonoesterice ale catenelor de DNA la diesterfosfați* 105
IV.5.4. *Rolul in vivo al DNA-ligazelor* 107
Bibliografie 109

V. Vehicule (vectori) 112
V.1. Elemente extracromozomale. Plasmide bacteriene 114
V.1.1. *Clasificarea plasmidelor* 114
V.1.2. *Compoziția fizică a plasmidelor* 116
V.1.3. *Masele moleculare ale DNA plasmidic* 117
V.1.4. *Conformațiile moleculare ale DNA plasmidic* 118
V.1.5. *Calculul coeficienților de sedimentare ai diferitelor conformații de DNA* .. 121
V.1.6. *Replicarea DNA plasmidic* 122
V.1.7. *Mobilizarea (transferul) plasmidelor curent folosite în tehnologia DNA recombinant* 128
V.1.8. *Separarea DNA plasmidic de cel cromozomal* 130
V.2. Construirea de vehicule derivate din plasmida Col E_1 135
V.3. Descrierea unor vehicule 135
V.3.1. *Plasmida pBR322* 135
V.3.2. *Bacteriofagul λ* 138
V.3.3. *Virusul tumoral SV40* 146
Bibliografie 157

VI. Pasageri (gene) 160
VI.1. Izolarea pasagerilor cu enzime specifice 161
VI.1.1. *Izolarea cu enzime de restricție* 161
VI.1.2. *Alte metode enzimatice* 162
VI.2. Sinteza enzimatică a pasagerilor 162
VI.2.1. *Transferul de informație de la RNA la DNA* 162
VI.2.2. *Unele proprietăți generale ale virusurilor tumorale RNA* 163
VI.2.3. *Descoperirea DNA polimerazei RNA dependentă (reverstranscriptază)* 164
VI.2.4. *Utilizarea reverstranscriptazei pentru sinteza pasagerilor (genelor)* 172
VI.3. Sinteza chimică a pasagerilor (genelor) 175
VI.3.1. *Metoda I-a sau metoda fosfodiesterilor a lui Khorana și colab.* 177
VI.3.2. *Metoda a II-a sau metoda fosfotriesterică a lui Itakura și colab.* 186
VI.4. Pregătirea unor pasageri pentru inserția în vehicul 193
VI.5. Principii generale de exprimare a genelor-pasager 195
VI.5.1. *Exprimarea genelor eucariote (pasager) în bacterii* 195
VI.5.2. *Exprimarea genelor procariote (pasager) în celulele mamiferelor* 197
Bibliografie 200

VII. **Proprietățile celulelor-gazdă în care se replică DNA recombinant** 203
VII.1 *Escherichia coli* 203
VII.1.1. *Factorii de virulență* 204
VII.1.2. *E. coli K12* 204
VII.2. *Bacillus subtilis* 208
Bibliografie 209

VIII. **Metode de identificare a DNA recombinant** 210
VIII.1. Excizia segmentului de DNA introdus în DNA recombinant 210
VIII.2. Identificarea directă a DNA recombinant prin testul de hibridizare 212
VIII.3. Identificarea chimică a pasagerului 213
VIII.3.1. *Determinarea secvențelor bazelor sale* 213

Bibliografie 219

IX. **Realizări** 220

IX.1. Construirea DNA recombinant conținînd gena somatostatinei 221
IX.1.1. *Planul general al construirii DNA recombinant* 221
IX.1.2. *Identificarea somatostatinei în celulele bacteriene* 226
IX.2. Construirea DNA recombinant conținînd gena insulinei 226
IX.2.1. *Aspecte structurale ale genei insulinei de șobolan* 227
IX.3. DNA recombinant conținînd gene ale virusului hepatitei B (VHB) 232
IX.3.1. *Cîteva date despre virusul hepatitei B* 233
IX.3.2. *Structura virusului hepatitei B* 233
IX.3.3. *Structura genomului virusului hepatitei B* 234
IX.3.4. *DNA recombinant conținînd gena pentru antigenele virusului hepatitei B* 235
IX.4. DNA recombinant conținînd gena hemaglutininei virusului gripal 236
IX.4.1. *Structura virusurilor gripale* 237
IX.4.2. *Cartarea genei hemaglutininei* 238
IX.4.3. *Structura hemaglutininei* 239
IX.4.4. *Sinteza genei hemaglutininei* 240
IX.4.5. *Obținerea de DNA recombinant conținînd gena hemaglutininei* 241
IX.5. DNA recombinant conținînd gena interferonului 244
IX.5.1. *Generalități. Definiție* 244
IX.5.2. *Clasificarea interferonilor umani (Hu-IFN)* 244
IX.5.3. *Unele proprietăți moleculare ale interferonilor* 245
IX.5.4. *Modul de acțiune a interferonilor (efectul antiviral)* 246
IX.5.5. *Metode convenționale de producere a interferonului* 247
IX.5.6. *Purificarea interferonului* 248
IX.5.7. *Structura primară a unor interferoni* 249
IX.5.8. *Producerea interferonului prin tehnologia DNA recombinant* 250
IX.6. Construirea de DNA recombinant conținînd gena ovalbuminei 254
IX.6.1. *Gena ovalbuminei* 255
IX.6.2. *mRNA pentru ovalbumină* 260
IX.6.3. *Etapele construirii DNA recombinant pentru ovalbumină* 260
IX.7. DNA recombinant obținut din operatorul *lac* și plasmida pMB9 266
IX.7.1. *Sinteza chimică a operatorului lac* 266
IX.8. Obținerea DNA recombinant prin experiment de tip shotgun 268
Bibliografie 269

X. **Perspective** 273
X.1. Perspective în medicină și în industria farmaceutică 273
X.1.1. *Diagnosticul prenatal* 274
X.1.2. *Prevenirea și vindecarea unor maladii ereditare* 274
X.1.3. *Tratamentul cancerului* 277

X.2. Perspective în domeniul agro-alimentar 278
X.2.1. *Fixarea biologică a azotului atmosferic* 280
X.2.2. *Posibilități de valorificare a fixării biologice a azotului* 283
X.2.3. *Alte perspective* 284
X.3. În domeniul industrial biotehnologia va înlocui petrochimia? 285
X.3.1. *Industria fermentativă și problema energiei* 285
X.3.2. *Industria alimentară* 286
XI. Biohazardul și măsurile de protecție în tehnologia DNA recombinant 288
XI.1. Măsuri generale de protecție 290
XI.2. Protecția biologică 291
XI.2.1. *Diferitele nivele de protecție biologică* 291
XI.3. Protecția fizică 292
Bibliografie 295
Apendix. Principalele metode utilizate pentru construirea moleculelor de DNA recombinant 297
Bibliografie 312
Molecular bases of recombinant DNA technology (presentation) 313

Glosarul

termenilor și prescurtărilor principale din text

A, acid adenozinmonofosforic (în cazul structurii RNA) sau acid deoxiadenozinmonofosforic (în cazul structurii DNA).

Amber, mutație care determină terminarea prematură a sintezei unui polipeptid. Este condiționată de apariția, în urma mutației, a codonului UAG, care constituie semnal de terminare.

Aminoacizi:

Ala — alanină	Leu — leucină
Arg — arginină	Lys — lizină
Asn — asparagină	Met — metionină
Asp — acid aspartic	Phe — fenilalanină
Cys — cisteină	Pro — prolină
Glu — acid glutamic	Ser — serină
Gln — glutamină	Thr — treonină
Gly — glicină	Trp — triptofan
His — histidină	Tyr — tirozină
Ileu — izoleucină	Val — valină

Amplificare, tratamentul culturii bacteriene cu cloramfenicol, pentru a mări proporția de DNA plasmidic în raport cu aceea a DNA cromozomal.

Antiparalele, două catene de DNA interacționate prin legături de hidrogen, una dintre catene avînd un sens, iar a doua — sens contrar.

Antisens, catenă de DNA care are aceeași secvență ca și mRNA (vezi mai departe).

AUG, codonul de inițiere din mRNA, responsabil de codificarea primului aminoacid dintr-o proteină (metionină).

ATG, codonul de inițiere din DNA; codifică primul codon din mRNA.

C, acid citidinmonofosforic (în cazul structurii RNA) sau acid deoxicitidinmonofosforic (în cazul structurii DNA).

Cap, prescurtarea structurii specifice a capătului 5′ al majorității mRNA din celulele eucariote; începe cu 7′ — metilguanozin-pppX, în care X este primul nucleotid codificat din DNA. Acest nucleotid este adăugat posttranscripțional lîngă secvența TATA (*v. cutie Hogness*).

Capăt coeziv, capăt monocatenar de DNA, format dintr-un număr variabil de nucleotide, aparținînd unei molécule bicatenare de DNA complementar cu al doilea capăt monocatenar al aceleiași molecule sau al unei alte molecule de DNA.

Capăt lipicios (sticky end), capăt coeziv.

cDNA, moleculă de acid deoxiribonucleic, complementară unui mRNA.

Clonă, grup de celule sau organisme cu structură ereditară identică și care s-au dovedit a proveni dintr-un singur parental. În cazul DNA recombinant, o clonă repre-

zintă colonia de celule generate de captarea unei singure molecule de DNA recombinant.

Codon, grup de trei nucleotide care codifică un aminoacid.

Cutie Hogness (cutie TATA), secvențe de nucleotide specifice regiunii promotorului unei gene eucariote.

Cutie Pribnow, secvența TATAATG de nucleotide specifice regiunii promotorului unei gene procariote.

Denaturarea — renaturarea DNA, proces în cursul căruia legăturile de hidrogen dintre baze se desfac, iar DNA bicatenar devine monocatenar. DNA bicatenar denaturat prin căldură, supus unei răciri lente, se renaturează în sensul că din moleculele monocatenare se refac molecule bicatenare.

DNA, acid deoxiribonucleic. Dacă alături de DNA nu se menționează conformația structurală (circulară, de exemplu) se înțelege că este vorba de DNA liniar, avînd caracteristicile structurale preconizate de modelul propus de Watson și Crick (1953).

DNA recombinant, moleculă de DNA obținută *in vitro* prin îmbinarea fragmentelor de DNA din specii biologice diferite sau a fragmentelor de DNA de la aceeași specie, îmbinate artificial în așa fel încît elementele genetice dobîndesc o structură aparte. În alți termeni, este vorba de îmbinarea unui vector cu un pasager (vezi mai departe). Trebuie precizat că în acest caz se înțelege o moleculă de DNA cu o structură autonomă, care este biologic activă în celula-gazdă, fie în cromozom, fie extracromozomal.

E. coli, tulpină de bacterie *Escherichia coli.*

Enzime de modificare, enzime care produc metilarea unor nucleotide cuprinse în secvența cu care interacționează enzimele de restricție. În anumite cazuri, enzimele de restricție acționează și ca enzime de modificare.

Enzime de restricție, enzime nucleolitice care scindează DNA *in vitro* sau in *vivo*, după interacțiunea lor cu o secvență nucleotidică particulară din catena moleculei de DNA.

Episom, fragment circular de genă.

Exon, porțiune de DNA care codifică pentru un mRNA matur.

Experiment de tip „shotgun", modalitate de obținere a DNA recombinant prin combinarea întîmplătoare a pasagerului dorit (aflat într-un amestec care conține și alți pasageri nedoriți). În acest tip de experiment pasagerul nu este deci purificat. El se găsește printre fragmentele de DNA cromozomal scindat de către enzime de restricție, de unde este captat la întîmplare de către un vehicul.

Excizie, reversul integrării.

Fenomen de restricție și de modificare, fenomen observat la tulpini de bacterii producătoare de enzime de restricție care degradează DNA din bacteriofag crescut pe alte tulpini bacteriene gazdă, îndată ce acesta a fost introdus în celulă. În contrast, tulpina poate fi infectată cu bacteriofag numai dacă acesta a fost cultivat în prealabil pe aceeași tulpină, deoarece activitatea de modificare protejează atît DNA fagic să se reproducă, cît și DNA celular propriu față de enzimele de restricție (prin metilarea secvenței de recunoaștere a enzimei de restricție).

G, acid guanozinmonofosforic (în cazul structurii RNA) sau acid deoxiguanozinmonofosforic (în cazul structurii DNA).

Gazdă, celule receptoare care posedă material genetic introdus artificial prin intermediul DNA recombinant.

Genă, unitate genetică funcțională constînd dintr-un fragment de moleculă de DNA (sau de RNA), cu o secvență specifică de nucleotide care conține informația genetică necesară pentru sinteza unui lanț polipeptidic sau pentru sinteza unei alte molecule.

Gene cu potențial de hazard, gene care sînt periculoase *(harmful)*, patogene pentru om, animale, plante și/sau mediul înconjurător.

Genom, DNA conținut într-o celulă sau virus, reprezentînd un ansamblu de informații genetice. (În alți termeni, toate genele unui organism sau ale unui individ.) În cazul virusurilor genomul poate fi reprezentat și de către RNA exclusiv.

Hazard biologic, biohazard sau *potențial de biohazard*, posibilitatea ca unele microorganisme, bacterii sau virusuri, în principal, care au dobîndit în mod artificial — prin intermediul moleculei de DNA recombinant — informații genetice noi, să devină periculoase pentru om și/sau mediul înconjurător.

Heteroduplex, moleculă bicatenară de DNA, formată din două catene diferite (provenite de la indivizi diferiți).

Hibridare celulară, transfer al unor cromozomi sau al unor gene din celulele unei specii (de exemplu, om) la o altă specie (de exemplu, plantă), în urma fuzionării artificiale a celor două specii de celule, facilitată de etilenglicol, virus Sendai sau chiar mecanic (cu ajutorul unui ac extrem de fin, care permite realizarea unei punți între citoplasmele celor două celule înainte de fuzionare).

Hibridizarea DNA, proces în timpul căruia se formează molecule hibride în care o catenă derivă de la o moleculă de DNA, iar cealaltă catenă de la o alta. Hibridizarea dovedește că moleculele de DNA a doi parteneri au secvența bazelor identică sau similară. Formarea moleculelor hibride este o măsură a relațiilor dintre acizii nucleici. Hibridizarea este dependentă de secvențele de baze, de masa moleculară, de forța ionică și de temperatura la care are loc procesul.

Himeră, (în tehnologia DNA recombinant), replicon construit artificial, din elemente genetice diferite.

Inginerie genetică, totalitatea operațiilor efectuate *in vitro* cu gene, cromozomi și uneori cu celule întregi, în scopul „construirii" unei structuri genetice cu proprietăți ereditare premeditate. Tehnologia DNA recombinant face parte din ingineria genetică și, deci, nu este sinonimă cu aceasta.

Integrare, recombinare în care elementele genetice sînt inserate.

Intron, secvență de nucleotide din genă, care este transcrisă dar nu apare în transcriptul final (mRNA).

Îmbinarea genelor („gene splicing"), operație prin care se atașează o moleculă de DNA de altă moleculă de DNA.

Îmbinarea RNA („RNA splicing"), îndepărtarea intronilor din mRNA precursor, pentru a asambla RNA matur.

Linker, fragment mic de DNA (în general de 4—10 baze) obținut sintetic și care conține un situs pentru o enzimă de restricție.

Microorganism transformat, microorganism care conține DNA recombinant inserat artificial.

mRNA, acid ribonucleic mesager.

Mutație nonsens, mutație care determină terminarea sintezei unui lanț polipeptidic.

Ochre, mutație condiționată de apariția codonului de terminare UGA.

ori, locul unde începe replicarea DNA.

Palindrom 1. Propozițiuni sau cuvinte care citite în ambele sensuri au același sens. (De exemplu, ELEVELE sau ELE FAC CAFELE). 2. (În tehnologia DNA recombinant). Secvențe de nucleotide din cele două catene de DNA din situsul de recunoaștere a enzimelor de restricție, care sînt identice citite în cele două sensuri. De exemplu, -G-A-A-T-T-C-. Deci secvența din catena de sus citită
-C-T-T-A-A-G-
dinspre stînga spre dreapta este identică cu secvența din catena de jos, citită dinspre dreapta spre stînga.

Pasager, fragment de DNA care conține una sau mai multe gene, obținut fie în urma scindării unui DNA nativ cu enzime specifice (de restricție), fie în urma sintezei sale enzimatice (în principal cu reverstranscriptază) sau chimice.

Protecție biologică, construirea prin tehnologia DNA recombinant sau printr-un alt procedeu de inginerie genetică a vehiculelor și a celulelor-gazdă, care datorită proprietăților lor biologice speciale nu pot trăi și disemina în mediul extern (laborator).

Recombinare, proces de formare a unui nou genotip, prin schimb de material genetic între doi parentali care diferă prin două sau mai multe proprietăți ereditare.

Replicon, entitate genetică capabilă de replicare autonomă în celulă (plasmidă, DNA virus SV40, DNA bacteriofag etc.).
RNA, acid ribonucleic.
rRNA, acid ribonucleic ribozomal.
Sistem gazdă-vehicul, sistem al unei celule-gazdă oarecare, care conţine vehicul sau vehicule.
T, acid deoxitimidinmonofosforic (din structura DNA).
TAA, *TAG*, *TGA*, codoni din DNA implicaţi în terminarea sintezei mRNA.
Tehnologia DNA recombinant, toate procesele biologice şi experimentale necesare pentru obţinerea DNA recombinant.
Transducţie, transferul materialului genetic de la o celulă la alta prin intermediul unui vector viral.
Transfecţie, infecţia unei celule cu DNA sau RNA izolat dintr-un virus.
Transformare, proces prin care celulele în stare competentă sînt capabile de a capta DNA liber, izolat din alte celule. Unele tulpini bacteriene pot fi făcute competente, ceea ce înseamnă că ele devin capabile să capteze DNA liber. În general, transformarea se rezolvă cu succes dacă DNA captat constă din fragmente de cromozom izolat din tulpini bacteriene apropiate.
tRNA, acid ribonucleic de transfer.
U, acid uridinmonofosforic (din structura RNA).
UAG, codon din mRNA responsabil de terminarea sintezei unei proteine. Induce mutaţie *amber*.
Vehicul (vector), structură genetică obţinută din DNA plasmidic, bacteriofagic, viral sau din alte surse, capabilă de a se replica autonom în celula-gazdă adecvată. Vehiculele pot fi combinate cu DNA străin (pasager) pentru a forma molecule de DNA recombinant. Vehiculele oferă DNA străin posibilitatea de a se reproduce în celula-gazdă.

Introducere

Ingineria genetică, termen ce părea a caracteriza o noţiune de domeniul ştiinţifico-fantasticului, cu perspective optimiste de realizare într-un viitor foarte depărtat, constituie astăzi o realitate bine conturată în domeniul ce îl reprezintă, face zi de zi progrese uluitoare cu perspective încă greu de estimat în totalitate. Realizările spectaculoase obţinute în ultimii ani au determinat o serie de oameni de ştiinţă să anticipeze că secolul viitor va fi dominat de ingineria genetică, aşa cum secolul nostru a fost dominat de cuceririle fizicii, cu referire la fisiunea nucleară, explorarea cosmosului, calculatoarele electronice etc.

Ingineria genetică este definită ca *un ansamblu de metode şi tehnologii efectuate* in vitro *cu gene, cromozomi şi, uneori, cu celule întregi, în scopul „construirii“ unei structuri genetice cu proprietăţi ereditare premeditate.* Se poate deci afirma că această ramură nouă a biologiei inaugurează de fapt era intervenţiei active a omului asupra patrimoniului ereditar al organismelor.

Dintre toate procedeele folosite de ingineria genetică pînă în momentul de faţă, cea mai prodigioasă s-a dovedit a fi aşa-numita *tehnologie a* DNA *recombinant*, ale cărei baze moleculare le prezentăm în această carte. Practic, această tehnologie — cu multiplele ei repercusiuni asupra dezvoltării ştiinţei şi chiar asupra societăţii — a determinat de fapt trecerea unui obstacol ce părea greu de acceptat pentru biologie şi anume transferul simplu al informaţiei genetice de la o specie la altă specie. După cum este cunoscut, în natură prin procesul recombinării genetice se produce în mod curent, dar cu o frecvenţă relativ scăzută, transferul informaţiei genetice numai între specii apropiate de organisme. Or, tehnologia DNA recombinant a stabilit metodologia pentru realizarea în eprubetă a fragmentării specifice a diferitelor genoame, a legării lor cu fragmente de DNA purtătoare ale unor informaţii genetice de interes şi apoi a exprimării într-un sistem celular adecvat. Ea a creat deci posibilitatea de a combina după dorinţă molecule de DNA — sub-

stanțe macromoleculare în care este înscrisă informația ereditară a tuturor ființelor vii — de la specii de organisme total neînrudite și de a forma organisme noi, cu caracteristici neîntîlnite în natură: bacterii care „fabrică" ovalbumină, hormoni cerebrali umani și alte substanțe, pentru care inițial nu dispuneau de informația genetică necesară.

Posibilitatea manipulării materialului genetic și a trecerii barierelor dintre specii se datorește unor descoperiri epocale privind structura și funcția DNA. Prima dintre acestea este cea realizată de grupul de cercetători condus de Avery (1944), care a stabilit în mod neechivoc că DNA înglobează în el informația genetică a organismului din care face parte și, ceea ce este esențial pentru tehnologia DNA recombinant, că DNA are capacitatea de a determina transformarea unui alt organism.

Dar, pînă a ajunge la stadiul actual al tehnologiei DNA recombinant, a mai fost nevoie de alte cîteva descoperiri, dintre care cele mai semnificative par a fi următoarele.

Este vorba în primul rînd de descoperirea structurii DNA de către Watson și Crick în 1953. Ea este considerată pe bună dreptate „un eveniment major al secolului nostru", care a produs „o explozie în biochimie, transformînd știința" (Sir Lawrence Bragg, Premiul Nobel pentru fizică 1915). Într-adevăr, după această descoperire s-a produs un salt imens în cunoștințele noastre despre organizarea materiei vii, marcînd istoric „sfîrșitul începutului" erei noi a biologiei moleculare. Prin formularea structurii macromoleculare a DNA s-a reușit explicarea însăși a mecanismului proceselor biologice fundamentale pe care le guvernează DNA, și anume stocarea și transmiterea informațiilor ereditare. S-a ajuns în acest fel la materializarea caracterelor ereditare, care definesc speciile și indivizii *printr-o structură unică* pe care o găsim în toate moleculele de DNA, reunite sub forma unui singur sau mai multor cromozomi.

Universalitatea structurii macromoleculare a DNA a generat ceea ce părea logic la început, iar experimental a putut fi dovedit doar în 1966, și anume că există un singur cod genetic pentru toate organismele. De aici a rezultat concluzia că unitatea funcțională dintr-un DNA care condiționează existența unui caracter ar trebui să se poată replica și exprima în orice fel de celulă.

Dar, pentru a ajunge să se manipuleze genele diferitelor organisme și să se dovedească ipoteza de mai sus, era nevoie să se găsească modalitatea scindării fine și reproductibile a materialului genetic. Acest fapt a devenit realizabil prin descoperirea *enzimelor de restricție și modificare*, care au pus la îndemîna geneticienilor instrumente inestimabile pentru „chirurgia" moleculară.

Este important de menționat aici că această descoperire este rodul cercetărilor interdisciplinare, în care aspectele de microbiologie au fost armonios îmbinate cu cele biochimice: primele au conturat fenomenul de restricție și modificare (Linn și Arber, 1965) iar ultimile au permis stabilirea mecanismului lor de acțiune (Smith și Wilcox, 1970).

Însă, pentru obținerea moleculelor recombinante de DNA, adică a acelor molecule care au material genetic asamblat artificial, era nevoie de descoperirea enzimelor care pot realiza legarea, „sudarea" fragmentelor de DNA între ele. Aceste enzime, denumite *DNA ligaze*, au fost descoperite atît în celulele normale, cît și în celulele infectate cu virus, iar o serie de cercetători au dovedit că ele pot fi utilizate pentru legarea componentelor genelor sintetizate chimic (Sgaramella și Khorana, 1972), precum și pentru introducerea de gene noi în unele organisme (Jackson și colab., 1972).

Tehnologia DNA recombinant nu s-ar fi putut dezvolta fără acele descoperiri care să fundamenteze, pe de o parte, modalitatea de a introduce moleculele de DNA străine în celulă, pentru a induce transformarea celulară — notînd contribuția esențială a lui Mandel și Higa (1970) —, iar pe de altă parte, cercetările complexe ale lui Cohen și Boyer (1973), care au pus bazele construirii de molecule de DNA hibride, capabile de a se autoreplica în celule.

Un alt factor important care a contribuit la impetuoasa realizare a tehnologiei DNA a fost descoperirea lui Sharp și colab. (1973), care a permis vizualizarea directă a DNA printr-o metodă simplă. Cu ajutorul ei se realizează astăzi estimarea maselor moleculare ale fragmentelor de DNA, se stabilește modul de acțiune a diferitelor enzime de restricție, se selecționează și se purifică diferite gene etc. Pînă la apariția metodei ui Sharp și a colaboratorilor săi, fragmentele DNA se puteau aprecia prin metoda viscozimetriei, a ultracentrifugării și altele, în general mult mai greoaie, care aveau și dezavantajul de a necesita cantități mari de DNA pentru analiză, oferind însă rezultate mai puțin exacte.

În țara noastră cercetările de inginerie genetică cunosc o efervescență fără precedent. Orientate spre studii moderne de mare perspectivă, cu aplicații în domeniul medicinii, agriculturii, industriei, ele sînt implicate în înfăptuirea obiectivelor stabilite de programul dezvoltării multilaterale a României. Este bine cunoscut că proiectul „Program-directivă de cercetare științifică, dezvoltare tehnologică și de introducere a progresului tehnic în perioada 1981—1990 și direcțiile principale pînă în anul 2000" acordă o atenție deosebită cercetărilor de inginerie genetică, ce sînt chemate să participe la aprofundarea mecanismelor biologice fundamentale și să le aplice în practică.

În acest context, o serie de unități de cercetare cum sînt Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau", Institutul „Dr. Ion Cantacuzino", Institutul de Științe Biologice, Universitatea București și altele se preocupă intens de cercetări de inginerie genetică.

Astfel, în cadrul Laboratorului Central de Acizi Nucleici din Institutul de Virusologie „Ștefan S. Nicolau" se desfășoară cercetări de caracterizare a unor mutanți termosensibili (ts) de virus herpes simplex, precum și cercetări de izolare, purificare și caracterizare fizico-chimică a

enzimelor de restricție și a unor vehicule curent utilizate în tehnologia DNA recombinant (DNA din virusul SV40, din fagul λ, din plasmide) în scopul elaborării unor noi mijloace terapeutice.

În Laboratorul de Genetică al Universității București s-au obținut varietăți haploide la mai multe specii de plante, realizare de mare interes pentru agricultura din țara noastră.

Cercetările întreprinse în cadrul Colectivului de Inginerie Genetică Bacteriană din cadrul Institutului de Științe Biologice București urmăresc atît elucidarea unor aspecte privind mecanismul molecular al fixării biologice a azotului, cît mai ales obținerea de noi bacterii fixatoare de azot — prin transfer de gene — în scopul aplicării lor sub formă de îngrășăminte bacteriene, care să ducă la creșterea fertilității solului.

AUTORII

I. Relația acizi nucleici — proteine
(GENERALITĂȚI)

Descoperirea și elucidarea relației existente între acizii nucleici și proteine reprezintă fără îndoială una dintre cele mai mari realizări ale secolului nostru. Pînă acum 30 de ani s-a crezut că proteinele conțin informația genetică necesară reproducerii lor. Cercetările sistematice asupra structurii și funcției proteinelor și acizilor nucleici au arătat însă că proteinele nu pot servi ca matrițe pentru propria lor replicare și ca atare ele nu pot funcționa ca elemente genetice. În schimb, s-a putut constata cu multă claritate că acizii nucleici sînt purtătorii informației genetice (*Avery* și colab., 1944; *Boivin* și colab., 1948 ș.a.). Totodată s-a dedus că ei nu pot realiza o serie de funcții catalitice indispensabile vieții celulare, funcții pe care le îndeplinesc proteinele. Ca o consecință a acestei situații a rezultat că, organizarea fundamentală a organismelor se bazează pe relația dintre acizii nucleici și proteine; în această relație interdependența este indispensabilă pentru existența și funcția ambelor componente esențiale ale tuturor celulelor. Rolul principal al acizilor nucleici este acela de a specifica, controla și dirija sinteza proteinelor, incluzînd în aceasta toate procesele care stabilesc structura lor primară, secundară și terțiară, timpul lor de apariție și rata lor de producere.

Imediat după descoperirea în anul 1953, de către Watson și Crick, a structurii „elicei duble" s-a ajuns la concluzia că informația genetică a organismelor este conservată în această moleculă, sub forma unei succesiuni de elemente numite nucleotide.

Mesajul genetic (informația genetică) pentru sinteza unei anumite proteine este înscris în dubla elice a acidului deoxiribonucleic (DNA) localizat în nucleul celular. Întrucît DNA nu participă direct la sinteza proteinelor, informația conținută în molecula lui este *transcrisă* cu ajutorul unei enzime specifice — denumită RNA polimerază DNA dependentă — într-un acid ribonucleic. Enzima realizează de fapt copierea secvenței bazelor DNA într-o secvență complementară de baze RNA. Datorită faptului că acidul ribonucleic transferă mesajul genetic de la

DNA la locul sintezei proteinelor, el este denumit acid ribonucleic mesager (mRNA). Acest acid nucleic, odată sintetizat în nucleu, traversează membrana nucleară și pătrunde în citoplasma celulei, unde prin intermediul particulelor ribozomale — componente formate din acid ribonucleic (rRNA) și proteine — se traduce mesajul conținut în secvența bazelor mRNA în proteine specifice, adică proteine avînd o anumită structură primară datorită secvenței acizilor aminați și o anumită configurație macromoleculară. Procesul de traducere a informației genetice, de sinteză propriu-zisă a proteinelor, este extrem de complex, iar etapele sale sînt în curs de descifrare. La realizarea acestui proces participă, alături de ribozomi și mRNA, și o serie de enzime, proteine specifice (factori ribozomali), precum și un acid ribonucleic specific, care transportă acizii aminați necesari înlănțuirii în proteine, motiv pentru care este denumit acid ribonucleic de transfer (tRNA). Transcrierea și traducerea informației genetice este redată schematic în fig. 1.

Fiecare proteină, care concretizează în final caracterul individului, este codificată de către un segment de DNA (genă). La celulele „procariote", adică celulele care au un nucleu nedelimitat printr-o membrană

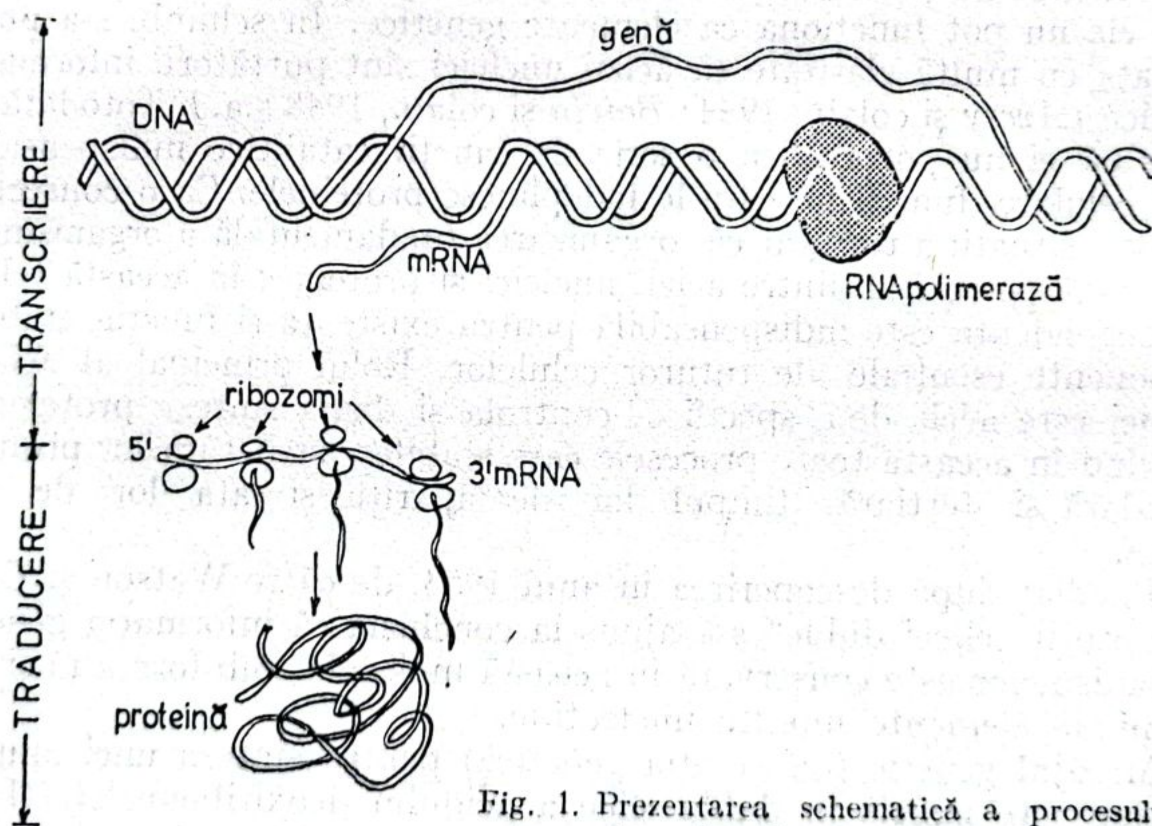


Fig. 1. Prezentarea schematică a procesului de transcriere și traducere a informației genetice.

nucleară (cazul bacteriilor), genele sînt colineare cu polipeptidele pe care le sintetizează. Cu alte cuvinte, la procariote mesajul genetic este înscris continuu, în interiorul genelor structurale nu există porțiuni netranscrise și netraduse.

I. 1. „O genă — un polipeptid"

Din punctul de vedere al geneticii, dezvoltarea și funcționarea unui organism constă în mod esențial dintr-un sistem de reacții chimice integrate, controlate de către gene. Încă din anul 1941, s-a presupus că genele care fac parte dintr-un sistem, controlează și reglează reacțiile specifice, fie acționînd direct ca enzime, fie prin determinarea specificității enzimelor. Pentru a cunoaște relația existentă între gene și proteine (enzime), calea cea mai indicată s-a dovedit a fi aceea de a urmări schimbările structurii proteinelor în funcție de modificările induse în structura genelor.

Un astfel de studiu sistematic efectuat asupra unor mutanți de *Neurospora*, a căror creștere s-a dovedit a fi dependentă de un singur factor, a permis lui Beadle și Tatum (1941) să emită ipoteza „o genă — o enzimă", conform căreia „gena și enzima sînt specificități de același ordin". Cu alte cuvinte, o anumită genă este implicată în sinteza unei singure enzime sau a altei proteine. Cînd o genă este modificată, enzima devine defectivă sau, mai simplu, nu mai este produsă. Mai mult chiar, în perioada în care nu se cunoștea natura chimică a genei, iar structura proteinelor era insuficient elucidată, Beadle (1945) afirma că gena acționează ca moleculă „master" sau matriță, dirijînd configurația finală a moleculei proteice, așa cum este ea asamblată din părțile componente.

Cercetările ulterioare de biochimie și biologie moleculară, dintre care amintim pe cele realizate de Pauling (1949), Ingram (1957), Janofsky și colab. (1964), Sarabhai și colab. (1964) ș.a. au precizat însă că relația „o genă — o enzimă" este un caz particular al relației generale „o genă — un polipeptid". Această relație, unanim acceptată azi, postulează că un segment de DNA reprezentînd o genă controlează sinteza unui singur polipeptid. Prin urmare, atunci cînd o proteină funcțională (o enzimă) este constituită din două sau mai multe polipeptide, acestea sînt sintetizate de gene distincte. După cum se va arăta relația „o genă — un polipeptid" este general valabilă, dar ea nu exclude existența unor excepții.

I. 2. Particularități întîlnite la eucariote

O situație diferită de aceea de la procariote, în ceea ce privește organizarea și exprimarea informației genetice, se întîlnește la organismele eucariote, al căror nucleu celular este delimitat printr-o membrană. La păsările și mamiferele studiate pînă acum s-a observat că secvențe

lungi de deoxinucleotide care intră în constituţia unei anumite gene nu sînt exprimate sub forma unor proteine.

S-a putut chiar preciza că aceste secvenţe, care nu se exprimă, sînt intercalate între porţiunile de gene care sînt transcrise în mRNA şi care deci dau naştere la proteine specifice. În consecinţă, conceptul de bază al coliniarităţii unei gene cu produsul polipeptidic pe care îl controlează, extins în mod natural la situaţia că secvenţa nucleotidelor pentru orice genă trebuie să fie continuă, a rămas valabilă doar pentru procariote (Flavell şi colab., 1978).

Pentru a exprima situaţia nouă, descoperită la eucariote în ultimii ani, s-a introdus o nouă terminologie: porţiunile de gene care se exprimă au fost numite *„exoni"*, iar cele care nu se exprimă se numesc *„introni"*. De exemplu, gena ovalbuminei de găină este compusă din opt exoni şi şapte introni (Kourilsky şi Chambon, 1978); gena lanţului β globinei de om conţine trei exoni şi doi introni, iar gena catenei grele a imunoglobulinei de şoarece este formată din patru exoni şi patru introni (Blanc, 1979).

Pentru exemplificare se va prezenta cazul relativ simplu al genei β-globinei de şoarece. Analiza ei structurală şi funcţională a arătat că ea este codificată discontinuu şi că fiecare locus genetic este mult mai complex decît s-a crezut iniţial. Locusurile par a fi constituite într-un dispozitiv care conţine mai multe porţiuni de gene autentice, alături de porţiuni de gene aparent inactive (Leder şi colab., 1980).

Discontinuitatea genei β-globinei de şoarece a fost dovedită prin două analize diferite:

— în primul rînd, prin examenul electronooptic al hibridului rezultat din gena β-globinei şi mRNA specific pe care îl codifică. Acest examen a arătat că hibridizarea are loc numai în anumite zone ale genei. De aici s-a dedus că în genă există secvenţe de DNA care au corespondenţă în mRNA (exonii) — acestea sînt locurile unde se formează hibridul DNA-RNA — şi secvenţe de DNA care nu au corespondenţă în mRNA (intronii), sugerate de absenţa hibridizării (Leder şi colab., 1977);

— în al doilea rînd, prin determinarea masei moleculare a mRNA precursor şi matur. Întrucît primul a avut masa moleculară de 1,5 perechi de kilobaze (Kpb), iar al doilea numai de 0,6 Kpb, înseamnă că o bună parte din mRNA precursor este eliminată în cursul maturării mRNA (Curtiss şi Weissmann, 1976). Schematic etapele principale ale maturării mRNA specific β-globinei de şoarece sînt redate în fig. 2.

Pînă în momentul de faţă funcţia intronilor nu este cunoscută. După unii autori, intronii nu conţin nici un mesaj. Ei par a fi prezenţi alături de exoni numai pentru a-i îndepărta. Procesul de îndepărtare

a intronilor se realizează în două etape. În prima etapă, RNA polimeraza DNA dependentă transcrie întregul mesaj genetic existent în genă, sintetizînd un RNA pre-mesager, adică un precursor de mRNA. Acest RNA conţine atît copia exonilor, cît şi cea a intronilor. În a doua etapă, RNA pre-mesager este supus, tot în nucleu, unei opera-

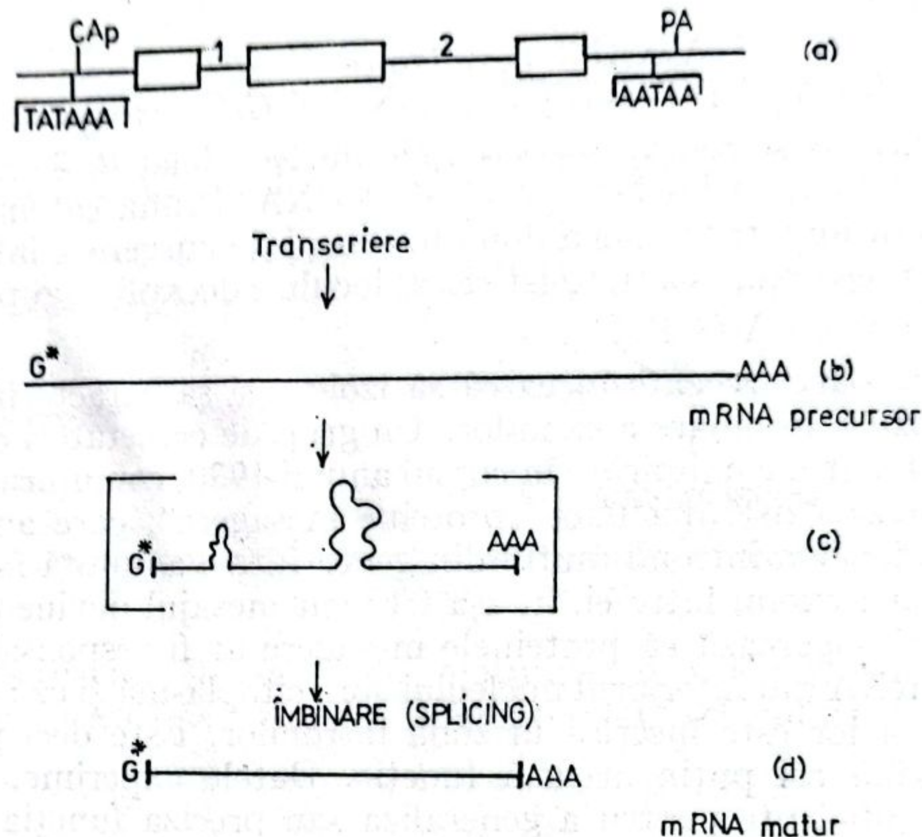


Fig. 2. Exonii şi intronii β-globinei de şoarece. Linia continuă arată localizarea intronilor, iar cutiile — localizarea exonilor. a) TATAAA reprezintă „secvenţa Hogness" caracteristică promotorului, iar AATAA — secvenţa caracteristică terminatorului. Literele cAp identifică locul de începere a sintezei mRNA, iar literele pA identifică locul de începere a secvenţei poli(A).
b), c) şi d) — etapele de maturare a mRNA (modificat după *Leder* şi colab., 1980).

ţiuni de excizie şi îmbinare *(splicing)*, ceea ce conduce la pierderea zonei intronilor. Această operaţiune constă în scindarea enzimatică a intronilor în dreptul zonei care îi separă de exoni şi anume în dreptul secvenţelor GT şi AT (sau AG) specifice frontierei de separaţie, urmată de îmbinarea exonilor între ei, pentru a da naştere unui mRNA care conţine mesajul genetic continuu. În final, mRNA astfel sintetizat trece din nucleu în citoplasmă — unde — la nivelul ribozomilor — dirijează sinteza proteinelor pe care o codifică.

După cum au arătat Rogers şi Wall (1980), splicingul intramolecular al mRNA — pus în evidenţă iniţial la mRNA specifici adenovirusului — este un proces general care are loc în cursul exprimării

numeroaselor gene eucariote. Acest proces pare a fi condiţionat de anumite secvenţe nucleotidice din gene. Pînă în prezent s-au conturat trei clase de secvenţe de DNA la locurile de splicing. Ele au fost puse în evidenţă în genele care controlează sinteza tRNA de cloroplaste, tRNA de drojdie şi mRNA de vertebrate. Fiecare clasă are secvenţe caracteristice. S-a remarcat că pentru vertebrate secvenţele optime la locurile de splicing sînt următoarele:

5'-(exon)-A-G/*G*-*T*-A-A-G-T-A-(intron)
-T-T-T-T-Y-T-T-T-T-T-T-C-T-T-N-C-*A*-*G*/G-(exon)-3'

Catena de mai sus se referă la secvenţele nucleotidelor de la capătul 5' al DNA, iar catena de jos la capătul 3' al DNA. Prima catenă are secvenţa ordonată împotriva, iar a doua în sensul de curgere a informaţiei.

Secvenţa cea mai caracteristică a locului de splicing pare a fi:

5'-G-T-(intron)-A-G-3'

Cercetări foarte recente încearcă să izoleze şi să caracterizeze enzimele de excizie şi îmbinare a exonilor. Un grup de cercetători condus de Slonimski a făcut o comunicare în cursul anului 1980, comunicare în care s-a emis ipoteza existenţei unor „proteine mesagere", care au proprietatea de a îndepărta intronii inutili din gene. Într-o anumită fază aceste proteine îmbină exonii între ei, în aşa fel încît mesajul devine continuu. Aceiaşi autori sugerează că proteinele mesagere ar fi responsabile şi de transferul mRNA din interiorul nucleului spre citoplasmă şi că informaţia pentru sinteza lor este înscrisă în zona intronilor. Este deci posibil ca intronii să aibă cel puţin această funcţie. Datele experimentale existente sînt insuficiente pentru a generaliza sau preciza funcţia exactă a intronilor. Este încă prea devreme să avem un răspuns clar la întrebarea: pentru ce organismele superioare (eucariote) au în DNA secvenţe nucleotidice neexprimate (introni), în timp ce această situaţie nu se întîlneşte la procariote?

Trebuie însă menţionat că atît unele date experimentale, cît şi unele analize teoretice pledează mai de grabă pentru atribuirea unui anume rol intronilor, decît a-i considera inutili. Astfel, Tonegawa şi colab. (1978) arată că în cazul imunoglobulinelor, intronii sînt riguros intercalaţi între exonii care codifică părţi moleculare proteice avînd fiecare funcţii imunologice bine definite în cadrul imunoglobulinei. Tonegawa sugerează că diferiţii exoni ai lanţului greu al imunoglobulinei iau naştere printr-o serie de duplicări ale unei gene primordiale. Prin această duplicare se realizează aşezarea *in tandem* a noilor copii de exoni, iar intronii au rolul de a racorda exonii între ei.

Mai mult chiar, Tonegawa (1978), pe de o parte, şi Gilbert (1978), pe de altă parte, susţin că intronii au un rol general în evoluţia speciilor. Aceasta ar consta în facilitarea fuzionării secvenţelor de DNA fără a deranja mesajul genetic al exonilor. În consecinţă, intronii nu sînt elemente inutile, ci dimpotrivă, ei contribuie la accelerarea evoluţiei orga-

nismelor superioare, pentru că ei condiționează aranjarea exonilor, ceea ce determină îmbogățirea patrimoniului ereditar cu unități genetice capabile să codifice proteine noi.

Prin urmare, la organismele superioare organizarea genelor este mult mai complicată decît la procariote. În plus, în transmiterea mesa-

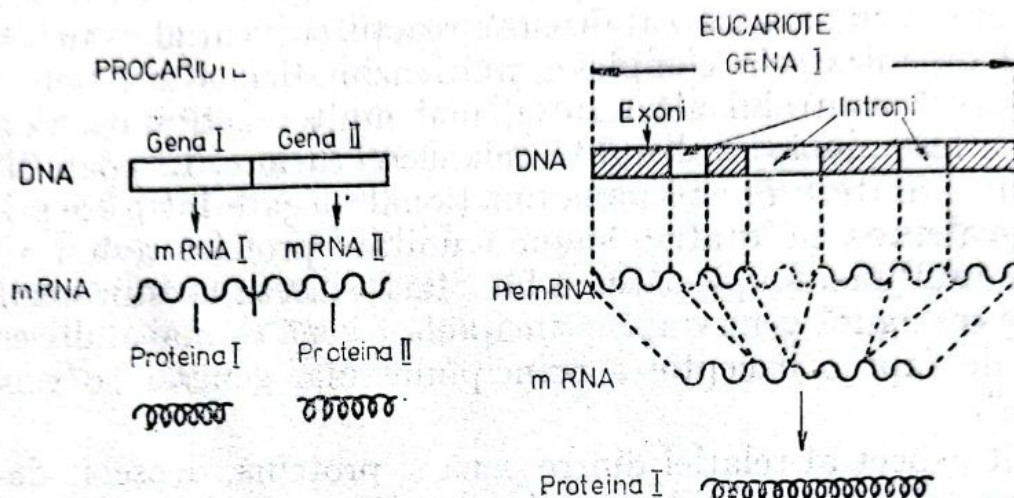


Fig. 3. Particularitățile structurale ale genelor procariote și eucariote.

jului genetic intervine și etapa de maturare a mRNA, inexistentă la organismele procariote. Aceste diferențe sînt schematic redate în fig. 3.

I. 3. O genă generează mai multe proteine ?

Descoperirea exonilor și a intronilor în genele organismelor superioare sau a genelor discontinue *(discontinuous genes)* cum le numesc Flavell și colab. (1978), a generat ipoteza conform căreia la eucariote o genă poate genera mai multe proteine (Tonegawa și colab., 1978; Gilbert, 1978). Aceștia din urmă susțin că, cunoscuta relație, considerată dogmă a biologiei moleculare, „o genă — o proteină (enzimă)" trebuie înlocuită printr-un principiu nou, care poate fi redat prin: „o genă — mai multe proteine". Ei arată că, teoretic, este posibil ca în momentul formării mRNA, numai unii exoni ai unei gene discontinue să fie legați împreună pentru a codifica o proteină de un anumit tip, în timp ce, în alte circumstanțe, exonii aceleiași gene îmbinați într-un alt mod, conduc la sinteza unei proteine de alt tip. Ca atare, o genă discontinuă ar conține de fapt informația genetică pentru mai multe tipuri de proteine. Cu toate că această ipoteză se bazează pînă în momentul de față pe relativ puține date experimentale — cazul imunoglobulinelor sau al unor virusuri, cum este virusul SV40, unde s-a observat formarea de

proteine noi, a căror existență a putut fi explicată doar prin noua ipoteză — ea trebuie reținută, întrucît se bazează pe existența exonilor și intronilor recent descoperiți, iar prezența lor clar dovedită va determina fără îndoială revizuirea cunoștințelor noastre de biologie moleculară.

Ideea aceasta este susținută și de Stark (1977) care consideră că proteinele multifuncționale sînt probabil sintetizate de către o singură genă. Aceste enzime, care catalizează reacții secvențiale sau asemănătoare, sînt organizate în complexe multienzimatice. Un astfel de aranjament asigură controlul alosteric al mai multor activități. Complexul enzimatic a fost pus în evidență în celulele eucariote. El poate fi constituit fie din diferite proteine monofuncționale legate între ele prin interacții necovalente, fie dintr-o singură unitate proteică avînd activități enzimatice multiple. După părerea lui Stark sinteza acestor enzime este dirijată de o singură genă după principiul „o genă — mai multe enzime", care este de fapt o excepție a principiului mai general „o genă — un polipeptid".

Un alt aspect al relației dintre genă și proteină, deosebit de important pentru tehnologia DNA recombinant, îl constituie exprimarea unor gene eucariote în sistem procariot. De exemplu, cazul particular al exprimării în celulele bacteriene a unor gene eucariote care codifică proteine complexe, cum sînt glicoproteinele.

Se pune următoarea problemă: bacteriile nu pot adăuga catenele de hidrați de carbon care sînt prezente în mod natural în molecula

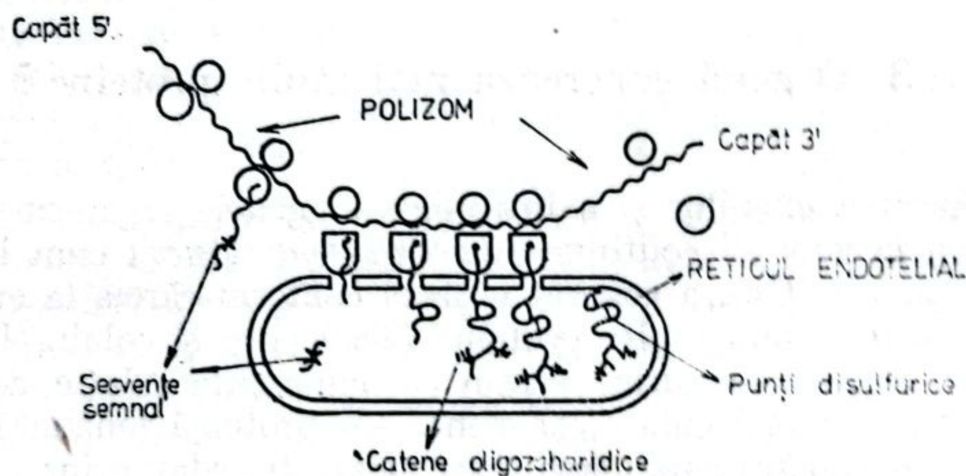


Fig. 4. Biosinteza proteinelor în celulele eucariote (după *Palade*, 1980).

glicoproteinelor sintetizate de celula eucariotă. Conform noilor date experimentale la eucariote adaosul de catene hidrocarbonate la polipeptide se face în momentul atașării polizomilor de membrana reticulilor endoplasmatici (fig. 4). În consecință, genele eucariote care codifică glicoproteine, introduse prin tehnologia DNA recombinant în bacterii pentru

a fi amplificate și exprimate vor genera doar partea proteică. De exemplu, interferonii sînt glicoproteine cu activitate antivirală (produse de celulele eucariote infectate cu virus) și care se exprimă cu o specificitate de specie caracteristică.

Întrucît s-a dovedit că interferonii au și un efect antitumoral remarcabil, producția industrială a interferonului a devenit azi o problemă de importanță majoră. Pentru a se ajunge la satisfacerea cerințelor de interferon s-a făcut apel și la tehnologia DNA recombinant. Cercetările întreprinse în acest scop au reușit să „determine" bacteria *E. coli* să producă interferoni umani (vezi pag. 250). Dacă rentabilizarea producției interferonului pe această cale rămîne o problemă de timp, ceea ce însă nu poate fi realizat în celulele bacteriene este adaosul de lanțuri oligozaharidice la interferonul sintetizat. Acest neajuns ar putea avea consecințe importante privind valoarea clinică a interferonului produs de bacterie (Weissman, 1980).

I. 4. Mecanisme de reglare a sintezei proteinelor

Introducerea unei gene (DNA) străine într-o celulă procariotă sau eucariotă în scopul exprimării ei nu se face la întîmplare. Gena trebuie să fie astfel plasată în noul sistem, încît să aibă orientarea corectă, adică ordinea nucleotidelor sale să se succeadă în sensul în care se face transcrierea (spre dreapta sau spre stînga) de către aparatul de transcriere special al gazdei. În plus, printre altele, ea trebuie pusă sub controlul mecanismelor de replicare ale gazdei. De asemenea, este obligatoriu ca ea să conțină semnalele specifice de inițiere și oprire a biosintezei proteinei pe care o codifică și controlează.

Mecanismele care controlează exprimarea informației genetice la bacterii sînt astăzi în general cunoscute, în principal datorită cercetărilor remarcabile ale lui Jacob și Monod (1961). O serie de autori au încercat să adapteze aceste mecanisme la organismele superioare (eucariote). S-a observat însă, că mecanismele similare sînt mult mai complexe și că, în momentul de față, este dificil de lămurit chiar aspectele lor generale, datorită cunoașterii insuficiente a însăși structurii genoamelor organismelor eucariote.

Mai mult chiar, cercetările arată că nucleul celulelor eucariote conține o cantitate mare de DNA, care este în exces față de cantitatea de informație necesară codificării proteinelor celulare. Considerînd mărimea unei gene eucariote similară cu aceea a unei gene procariote medii, lungimea DNA dintr-o celulă umană fiind de aproximativ 2 m, înseamnă că un astfel de DNA conține mai mult de un milion de gene, valoare ce depășește cu un ordin de mărime numărul genelor estimate la om de

către geneticieni. Calcule de acest fel au condus la concluzia că la eucariote numai 10% din DNA codifică proteine, iar restul de DNA participă la mecanismele de reglare și control al genelor (Brandbury, 1978).

I. 4.1. Reglarea sintezei proteinelor la procariote

Studiul sistematic al unor protein-enzime bacteriene a arătat că sinteza lor se găsește sub control dublu genetic. Acest control condiționează specificitatea enzimei, cantitatea ei și momentul în care ea se produce. Modelul cel mai cunoscut de control genetic al sintezei proteinelor este cel descris de Jacob și Monod (1961) și care, în linii mari, este unanim acceptat și azi.

Principalele sale caracteristici sînt următoarele: structura moleculară a unei proteine este determinată de elementele specifice denumite *gene structurale*. Prin acțiunea lor se formează *transcriptul* (mRNA), *mesagerul structural* care, la rîndul lui, sintetizează proteina. Sinteza mesagerului, realizată de genele structurale, este un proces secvențial replicativ, care poate fi inițiat numai în anumite puncte ale DNA. Transcrierea genelor structurale depinde de un singur punct de inițiere care se numește *operator*. Genele a căror activitate este astfel coordonată formează un *operon*.

Mesagerul structural este o moleculă instabilă de RNA (mRNA), care este distrusă în cursul procesului de transfer de informație. Rata sintezei mRNA controlează rata sintezei proteinelor. Un grup special de molecule, denumite *represori*, decid momentul de producere a mRNA care codifică proteina respectivă. Represorii specifici împiedică sinteza uneia sau a mai multor proteine. Blocarea sintezei proteinelor se realizează în momentul în care represorii se atașază de operatori. În modelul original al reglării sintezei proteinelor, descris de Jacob și Monod (1961), natura represorului nu era clar definită. Se bănuia însă că ar fi un RNA(?) carecare, ce ar avea secvența nucleotidelor complementară secvenței nucleotidelor operatorului cu care interacționează prin intermediul legăturilor de hidrogen. Astăzi însă, se știe că represorii sînt de natură proteică. De exemplu, represorul β-galactozidazei este un tetramer cu masă moleculară de 160 000, constituit din patru polipeptide de 40 000.

Represorii sînt codificați de *genele reglatoare*. Aceste gene nu contribuie cu informații structurale noi la sinteza proteinelor pe care le controlează. Represorii decid numai dacă proteinele controlate se sintetizează sau nu, cu alte cuvinte, decid funcționarea genelor structurale.

În anumite sisteme (sisteme de enzime inductibile), represorul tinde să se combine specific cu unele molecule mici, iar represorul combinat nu are afinitate pentru operator, ceea ce are ca rezultat activarea opero-

nului. În sistemele care determină sinteza enzimelor represabile, represorul însuși este inactiv, neavînd afinitate pentru operator. Combinîndu-se cu unele molecule mici (metaboliți specifici), el se activează, adică devine capabil de a se atașa de operator, blocîndu-i funcția. Moleculele mici care interacționează cu represorul au fost denumite *inductori* și

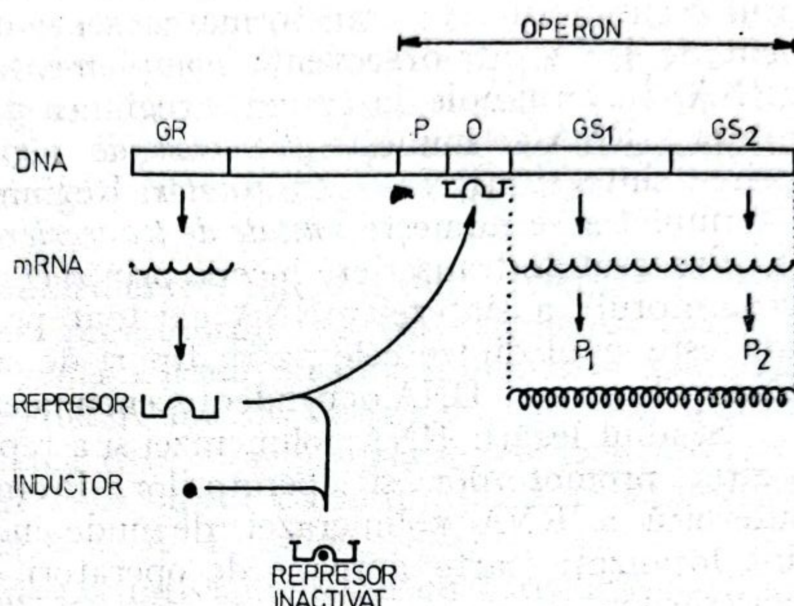


Fig. 5. Controlul genetic al sintezei proteinelor la procariote (modificat după *Jacob* și *Monod*, 1961).

corepresori, inductorii fiind molecule care inactivează, iar corepresorii — molecule care activează represorul.

În concluzie, sinteza unei proteine (enzime) într-o bacterie se găsește sub un dublu control (fig. 5). Pe de o parte, genele structurale determină organizarea (structura) moleculară a proteinei. Pe de altă parte, alți determinanți genetici — denumiți gene reglatoare — controlează rata sintezei proteinelor prin intermediul represorilor. Aceștia pot fi inactivați de inductori sau activați de corepresori, care sînt metaboliți specifici. Acest sistem de reglare operează prin intermediul mRNA sintetizat de gene, care la nivelul ribozomilor dirijază sinteza proteinelor.

I.4.2. Cîteva date privind transcrierea informației genetice

S-a arătat că în reglarea sintezei proteinelor atît genele structurale care formează operonul, cît și genele reglatoare, operează prin intermediul mRNA, care dirijază direct sinteza proteinelor structurale cu funcție represoare (represorii). Sinteza intermediarului reprezintă de fapt însuși procesu de transcriere. Acesta este un proces complex, prin care informația genetică existentă în DNA este transferată moleculelor de mRNA cu funcție de mesager. Procesul este realizat de un ansamblu de componente care formează împreună aparatul de transcriere și care

trebuie să funcţioneze cu maximum de fidelitate asigurînd ca mesajul genetic să fie corect înregistrat în mRNA. Fidelitatea şi specificitatea transcrierii este asigurată atît de interacţiuni de tipul celor existente între perechile de baze complementare — deci de tip acid nucleic-acid nucleic — cît şi de interacţiuni de tip acid nucleic-proteină. În acest proces matriţa este DNA (genele), iar copia sau transcriptul este mRNA. Rezultatul transcrierii este transformarea secvenţei nucleotidelor unui segment de DNA într-o secvenţă complementară de nucleotide ale unui mRNA. În terminologia curentă, regiunea genei (matriţei) care iniţiază sinteza mRNA se numeşte *promotor*, iar regiunea genei care determină oprirea sintezei mRNA — *terminator*. Regiunea cuprinsă între promotor şi terminator se numeşte *unitate de transcriere*.

Procesul de transcriere începe prin recunoaşterea locului de iniţiere (promotorul) a sintezei mRNA existent pe DNA de către factorul σ, care este unul dintre cele patru tipuri de subunităţi (α, β, β' şi σ) ale RNA polimerazei DNA dependente, enzima care dirijează sinteza mRNA.

Studiul legării RNA polimerazei şi a represorilor de DNA a precizat poziţia promotorilor şi operatorilor. Promotorii — locurile de fixare puternică a RNA polimerazei, de unde începe transcrierea mRNA — sînt localizaţi foarte aproape de operatori — locul specific de fixare a represorilor.

În locul în care s-a ataşat RNA polimeraza se produce desfacerea celor două catene ale matriţei, iar enzima iniţiază sinteza mRNA în direcţia 5'---3'. Numai una dintre catenele matriţei de DNA este transcrisă (transcriere asimetrică). După iniţierea sintezei mRNA, factorul σ se detaşază de corpul enzimei (constituit din subunităţile α, β, β'), care continuă sinteza mRNA. Factorul detaşat este capabil de a se lega de un alt corp de RNA polimerază, pentru a iniţia un alt ciclu de transcriere. Terminarea sintezei mRNA este condiţionată de un semnal, existent sub forma unei secvenţe specifice de baze în molecula DNA, pe care îl recunoaşte o proteină specifică denumită factorul ρ.

I.4.3. Semnificaţia unor secvenţe de nucleotide din DNA

În etapa actuală a cercetărilor de biologie moleculară, genele se obţin prin trei metode diferite:

— prin izolare cu ajutorul enzimelor de restricţie din genomul celular sau viral;

— prin sinteză enzimatică, utilizînd ca matriţă mRNA şi enzima de sinteză reverstranscriptaza;

— prin sinteză chimică, utilizînd procedeele chimiei organice.

Pentru ca genele să devină funcţionale, adică să fie capabile să se exprime în momentul în care sînt introduse prin tehnologia DNA recom-

binant într-un sistem bacterian adecvat, ele sînt izolate, sintetizate sau pregătite astfel încît să conțină semnalele adecvate transcrierii și traducerii lor.

Așa cum au precizat foarte recent Riggs și Itakura (1979), există dovezi evidente că genele eucariote funcționează în bacterii și că nu există nici o barieră fundamentală care să împiedice transcrierea și traducerea genelor eucariote în procariote. Cheia exprimării eficiente pare a fi prezența în genele străine a semnalelor adecvate în poziția corectă. De asemenea, gena eucariotă introdusă trebuie să fie în fază, să conțină un situs care determină legarea la ribozom, să fie în aval de un promotor bun și să conțină situsurile de inițiere și terminare a traducerii.

I.4.3.1. **Secvențele promotorului și inițiatorului.** Referitor la secvențele nucleotidelor din zona promotorului se poate spune că, pînă în prezent, nu există o definiție concisă și universală a promotorului la nivel de nucleotide. Cu toate că s-au determinat secvențele nucleotidelor pentru mai mulți promotori se remarcă existența unei slabe omologii între ei. Ceea ce devine însă evident este faptul că majoritatea promotorilor conțin numeroase perechi de baze A: T (Calos, 1978).

În bacterii, RNA polimeraza interacționează cu o regiune a DNA care cuprinde aproximativ 40 de baze situate înaintea locului de inițiere a transcrierii (Gilbert, 1976). Aceasta ar fi deci zona promotorului. Cea mai bine definită zonă a promotorului este „cutia Pribnow", care conține secvența TATPuATG localizată înaintea locului de pornire a sintezei mRNA (Maxam și colab., 1977). Ulterior s-a arătat că secvențele TATAAA (Galibert și colab., 1979) sau TATAAATA (Soeda și colab., 1980) corespund semnalului de inițiere a transcrierii.

De asemenea, este important de menționat existența codonilor specifici pentru inițierea transcrierii. Dintre aceștia cel mai cunoscut este codonul ATG, frecvent întîlnit în poziția în care începe transcrierea mRNA (Galibert și colab., 1979; Soeda și colab., 1980).

I.4.3.2. **Secvențele terminatorului.** Analiza secvenței nucleotidelor din zona genelor unde se termină transcrierea mRNA a pus în evidență prezența unor triplete de nucleotide (codoni) specifice de tipul TAG, TGA, TAA. Prezența lor în aceste locuri a fost corelată cu posibila lor funcție ca semnale de terminare a sintezei mRNA și, în consecință, de terminare a lanțului polipeptidic (Soeda și colab., 1980). Și în acest caz este de remarcat că, pentru moment nu există o definiție universală a terminatorului la nivel de nucleotide. Totuși, regiunile de nucleotide homopolimerice de tip ...AAAAA... (Adhya și Gottesman, 1978)
...TTTTT...
sau secvențele AATAA (Leder și colab., 1980) par a fi implicate în terminarea transcrierii.

I. 4.3.3. **Secvența Shine-Dalgarno.** Pe baza unor observații experimentale, Shine și Dalgarno (1974) au emis ipoteza conform căreia nucleotidele terminale ale rRNA 16S au un rol esențial în legarea mRNA de subunitatea ribozomală 30S [1]. Elucidarea structurii primare a capătului 3′ al rRNA 16S, precum și a locului de legare de ribozom a mai multor mRNA a sugerat că interacțiunea mRNA-rRNA 16S este într-adevăr esențială pentru procesul de recunoaștere. Ribozomul selecționează locul corect de legare a mRNA datorită interacțiunii dintre secvența nucleotidelor de la capătul 3′ al rRNA 16S și o secvență scurtă, complementară, din mRNA, situată aproape de codonul de inițiere (Baan, 1977).

Pe de altă parte, așa cum s-a arătat, exprimarea genelor străine introduse prin tehnologia DNA recombinant în celulele bacteriene depinde de existența alături de aceste gene, a secvențelor de baze care codifică locul de legare a mRNA de ribozom (Emtage și colab., 1979; Riggs și Itakura, 1979).

Structura primară a capătului 3′ al rRNA 16S implicat în legarea mRNA este 5′...AUCACCUCCUA$_{OH}$ 3′ (Sprague și Steitz, 1975), iar secvențele de nucleotide din DNA care codifică regiuni ale mRNA, responsabile de atașarea de ribozom, au probabil următoarea structură: TCTTCTG, CTTCC, CCTTCC (Soeda și colab., 1980). Aceste secvențe sînt cunoscute în literatură sub denumirea de „secvențe Shine-Dalgarno" sau pe scurt secvențe SD.

I.4.3.4. **Elementele genetice esențiale necesare exprimării unei gene eucariote în sistem procariot.** Sinteza unei proteine eucariote într-un sistem procariot depinde, în mod esențial, de locul în care a fost introdusă gena structurală care codifică proteina respectivă, în raport cu elementele genetice care controlează transcrierea și traducerea unui operon din gazdă. Astfel, cercetări foarte recente, care vor fi prezentate ulterior au arătat că celulele bacteriene pot sintetiza insulină, ovalbumină și multe alte proteine eucariote, numai atunci cînd genele corespunzătoare au fost introduse sub controlul genetic al unui operon adecvat.

Unii cercetători au izolat regiunea de control a operonului *lac* (Itakura și colab., 1977), iar alții regiunea de control a operonului *trpE* (Emtage și colab., 1979) din bacteria *E. coli* și le-au utilizat pentru exprimarea genelor străine. Elementele esențiale ale operonului *lac* sînt: promotorul, operatorul, locul de inițiere a sintezei mRNA, locul atașării de ribozom, secvența de nucleotide corespunzătoare sintezei β-galactozidazei (Heyneker și colab., 1976). După cum precizează Riggs și Itakura (1979), secvența locului de atașare de ribozomi este necesară

---

[1] Subunitatea ribozomală de 30S este formată din rRNA și din 21 proteine diferite.

numai atunci cînd se urmărește sinteza unei proteine ca atare, și nu sub formă de peptid precursor. În practică, se izolează sau se sintetizează întîi aceste elemente, care se cuplează apoi cu gena străină. Produsul fuzionat se introduce într-un vehicul bacterian adecvat pentru a fi exprimat. De exemplu, în cazul în care s-au cuplat elementele operonului

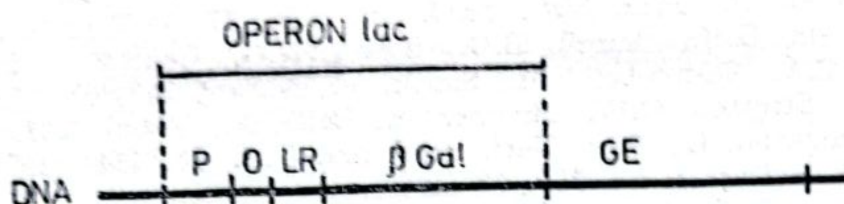


Fig. 6. Poziția corectă a unei gene eucariote (GE), introdusă într-un sistem procariot, față de principalele elemente de control ale unui operon *lac*: P — promotor; O — operator; LR — loc de legare la ribozom; β-Gal — gena structurală a β-galactozidazei. Plasată în această poziție gena eucariotă se poate exprima în celula bacteriană.

lac cu gena insulinei, bacteria transformată va sintetiza o proteină fuzionată, conținînd β-galactozidază și insulină (Riggs și Itakura, 1979). Poziția genei străine față de elementele esențiale de control este prezentată schematic în fig. 6.

Bibliografie

1. Adhya, S., Gottesman, M.A., *Rev. Biochem.* 47, 967 (1978).
2. Avery, O., McLeod, C. M., McCarty, M., *J. Exp. Med.*, 79, 137 (1944).
3. Baan, R.A., Teză de doctorat, Leiden (1977).
4. Beadle, G. W., Tatum, E.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 27, 499 (1941).
5. Beadle, G.W., *Chem. Rev.*, 37, 15 (1945).
6. Blanc, M., *La Recherche*, 10, 896 (1979).
7. Boivin, A., Vendrely, R., Vendrely, C., *C.R. Acad. Sci.* Paris, 226, 1061 (1948).
8. Brandbury, M., *La Recherche*, 91, 644 (1978).
9. Calos, M.P., *Nature*, 274, 762 (1978).
10. Curtis, P.J., Weissmann, C., *J. Mol. Biol.*, 106, 1061 (1976).
11. Emtage, J.S., Tacon, W.C.A., Catlin, G.H., Jenkins, B., Porter, A.G., Carey, N.H., *Nature*, 283, 171 (1980).
12. Flavell, R.A., Glover, D.M., Jeffreys, A.J., TIBS, noiembrie 241 (1978).
13. Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., Charnay, P., *Nature*, 281, 646 (1979).
14. Gilbert, W., in *RNA polymerase*, ed. Lasick, R & Chamberlin, M. p. 193 (1976).
15. Gilbert, W., *Nature*, 207, 501 (1978).
16. Heyneker, H.L., Shine, J., Goodman, H.M., Boyer, H.W., Rosenberg, J., Dickerson, R.E., Narang, S.A., Itakura, K., Linn, S., Riggs, A.D., *Nature*, 263, 748 (1976).
17. Ingram, V., *Nature*, 180, 326 (1957).
18. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., Boyer, H.W., *Science*, 198, 1056 (1977).
19. Jacob, F., Monod, J., *J. Mol. Biol.*, 3, 318 (1961).
20. Kourilsky, P., Chambon, P., *Trends Biochem. Sci.*, noiembrie 244 (1978).
21. Leder, P., Tilghman, S.M., Tiemeier, D.C., Polsky, F.I., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 42, 915 (1977).

22. Leder, O., Hansen, N.J., Konkel, D., Leder, A., Nishioka, Y., Talkington, C., *Science*, **209**, 1336 (1980).
23. Maxam, A.M., Tizard, R., Skryabin, G.K., Gilbert, W., *Nature*, **267**, 644 (1977).
24. Palade, G.E., *„Aspecte celulare ale secreției proteinelor"*, conferință, București 15 iulie (1980).
25. Pauling, L., Itano, H.A., Singer, S.J., Wells, I.C., *Science* **110**, 543 (1949).
26. Riggs, A.D., Itakura, K., *Am. J. Human. Gen.*, **31**, 531 (1979).
27. Rogers, J., Wall, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **77**, 1877 (1980).
28. Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.G., Goulson, A.R., Fiddes, I.C., Hutchinson, C.A., Slocombe, P.M., Smith, M., *Nature*, **265**, 687 (1977).
29. Sarabhai, A., Stretton, O.W., Brenner, S., Bolle, A., *Nature*, **201**, 13 (1964).
30. Shine, J., Dalgarno, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **71**, 1342 (1974).
31. Slonimski, P., *Science et vie*, **750**, 58 (1980).
32. Soeda, E., Arrand, J., Smolar, N., Walsh, J., Griffin, B., *Nature*, **283**, 445 (1980).
33. Sprague, K.U., Steitz, J.A., *Nucleic Acids Res.*, **2**, 787 (1975).
34. Stark, G.R., *TIBS*, **2**, 64 (1977).
35. Tonegawa, S., Maxam, A.M., Tizard, R., Bernhard, O., Gilbert, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **75**, 1485 (1978).
36. Weissman, C., *Nature*, **283**, 323 (1980).
37. Yanofsky, C. Carlton, B.C., Guest, J.R., Helinski, D.R., Henning, U., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **51**, 266 (1964).

II. Tehnologia DNA recombinant

De la bun început trebuie precizat că tehnologia DNA recombinant nu este sinonimă cu ingineria genetică. Aceasta din urmă include toate procedeele efectuate *in vitro* cu gene, cromozomi și uneori cu celule întregi în scopul „construirii" unei structuri genetice cu proprietăți ereditare premeditate. Or, tehnologia DNA recombinant se referă numai la metodologia obținerii de DNA recombinant, adică de realizarea *in vitro* a unor molecule de acid deoxiribonucleic prin îmbinarea fragmentelor de DNA din specii biologice diferite sau chiar a fragmentelor de DNA de la aceeași specie biologică, aranjate însă artificial, în așa fel încît elementele genetice dobîndesc o structură aparte. Rezultă că tehnologia DNA recombinant este o parte integrantă a ingineriei genetice, care de fapt cuprinde o sferă mai largă de procedee.

Dintre celelalte procedee ale ingineriei genetice merită a fi menționate hibridarea celulară, de exemplu, care realizează transferul unor cromozomi sau a unor gene din celulele unei specii la o altă specie cu ajutorul fuzionării artificiale — facilitată de un virus sau de o substanță chimică — a celor două specii de celule. Sau așa-numitul procedeu „al lui Gurdon" — în care nucleul unei celule somatice conținînd întreaga informație genetică a unui organism (broasca, în experimentele lui Gurdon) este separat și introdus într-un ou denucleat, aparținînd aceluiași tip de organism. În condiții experimentale speciale, acest ou se dezvoltă normal și produce un organism identic cu cel din care provine nucleul. Se oferă în acest fel posibilitatea multiplicării, în mod premeditat, a unui număr nelimitat de indivizi cu proprietăți identice.

II.1. Schema generală a tehnologiei DNA recombinant

II.1.1. Vehicul sau vector

Introducerea într-o celulă a unei singure gene sau a mai multor gene noi, în speranța că ele se vor exprima și menține, nu este posibilă. Odată ajunse în celule aceste gene vor fi imediat distruse de către DN-azele celulare omniprezente în fragmente, iar informația genetică pe care o conțin va fi total pierdută. Ca operația să reușească este nevoie ca genele noi — purtătoare ale informațiilor genetice pe care dorim să le dobîndească un organism dat, să fie „sudate" de o moleculă de DNA care are proprietatea de a fi acceptată de celule și, în plus, să aibă și capacitatea de a se automultiplica în celulele respective. În acest fel am definit chiar termenul frecvent folosit în tehnologia DNA recombinant de *vehicul* sau *vector*, capabil de a transporta gena(ele) și de a le multiplica în celule. Este de remarcat că vehiculul este de fapt ceea ce definește Jacob și colab. (1963) un *replicon*, adică o entitate genetică capabilă de replicare autonomă în celulă. Rolul de vehicul îl poate avea atît DNA plasmidial (în principal plasmidele din *E. coli* sînt preferate pentru motivele arătate în continuare), cît și DNA din bacteriofagul λ, virusul SV40, adenovirus sau alte virusuri. În general, vehiculele sînt molecule de DNA circulare.

II.1.2. Pasager

Un alt termen pe care îl definește tehnologia DNA recombinant este acela de *pasager*. Prin acesta se înțelege fragmentul de DNA străin conținînd gena sau genele de interes care se introduc în vehicul pentru multiplicare. Pasagerul poate fi izolat sau preparat prin mai multe metode și anume:

a) metoda izolării cu enzime specifice: DNA conținînd gena de interes este fragmentat cu enzime de restricție. Urmează apoi identificarea fragmentului care conține gena, izolarea și pregătirea lui pentru a-l introduce în vehicul;

b) metoda enzimatică: se izolează mai întîi RNA mesager care dirijează sinteza unei proteine anumite pe care dorim să o multiplicăm (insulina, de exemplu). Etapa următoare cuprinde sinteza genei pentru proteina respectivă folosind RNA mesager izolat ca matriță și reverstranscriptază ca enzimă de biosinteză. Aplicarea metodei este limitată în multe cazuri de dificultatea izolării mRNA;

c) metoda chimică: se realizează cu ajutorul tehnicilor dezvoltate de chimia organică, a sintezei chimice a genei de interes fără

intermediul unui tipar genetic preexistent. Înainte de a începe sinteza genei este deci necesar să se cunoască secvența nucleotidelor sale. Această metodă va deveni în viitor cea mai accesibilă.

Menționăm că cele trei metode au fost folosite cu succes pentru izolarea de gene atît în tehnologia DNA recombinant, cît și în alte scopuri.

II.1.3. Deschiderea vehiculului

Pentru a introduce însă pasagerul în vehicul este necesar în primul rînd să se producă scindarea specifică a vehiculului, mai ales că acesta, așa cum am precizat mai înainte, este în general o moleculă circulară de DNA. Scindarea sau deschiderea moleculei circulare trebuie însă astfel efectuată încît funcția ei esențială de autoreplicare să nu fie afectată. Locul scindării nu trebuie să fie deci situat, de exemplu, în acea zonă a moleculei care controlează sinteza DNA sau anumite funcții esențiale. De asemenea, este de preferat ca scindarea să se facă doar într-un singur loc al moleculei, obținîndu-se doar conversia moleculei circulare într-o moleculă liniară. Pentru a se realiza acest deziderat în tehnologia DNA recombinant se folosesc enzimele de restricție. Aceste enzime, foarte recent descoperite, „fragmentează DNA *in vitro* numai după interacțiunea — care poate reprezenta, de fapt o etapă de activare — cu o secvență particulară de nucleotide în interiorul lanțului molecular al DNA" (Arber, 1977) și permit scindarea în locuri limitate a moleculelor de DNA.

Dacă scindarea vehiculului s-a făcut cu aceeași enzimă de restricție cu care s-a făcut și izolarea pasagerului, înseamnă că cele două molecule de DNA vor avea capetele cu secvență nucleotidică identică, fiindcă o anumită enzimă de restricție scindează întotdeauna în dreptul unei secvențe particulare de nucleotide. Mai mult chiar, unele enzime de restricție generează capete coezive *(sticky ends)* la moleculele de DNA pe care le scindează. Ca atare, există posibilitatea ca datorită acestei particularități capetele vehiculului să se lipească de capetele pasagerului, obținîndu-se o moleculă hibridă care cuprinde atît vehiculul, cît și pasagerul. Nu trebuie omisă însă și cealaltă alternativă și, anume, cea care produce autocircularizarea fragmentelor de DNA.

II.1.4. Formarea de capete coezive la vehicul sau/și pasager

Uneori folosirea enzimelor de restricție nu este indicată pentru izolarea pasagerului, fiindcă ele determină scindarea moleculei exact în zona genei de interes. Pe de altă parte, unele enzime de restricție generează capete tocite *(blunt ends)* la moleculele de DNA ale vehi-

culului sau ale pasagerului, care nu se pot lipi specific. În aceste cazuri, atașarea pasagerului de vehicul se poate face numai dacă se construiesc artificial capete coezive. Se folosesc în acest scop mai ales două metode speciale:

— prima metodă constă în adăugarea, cu ajutorul transferazei terminale, unor secvențe de poli (dA), la capetele vehiculului, și de secvențe de poli (dT) la capetele pasagerului. Prin același procedeu se pot crea capete coezive de poli (dG) la vehicul și de poli (dC) la pasager. În acest fel s-a creat situația ca cei doi parteneri (vehicul și pasager) să aibă capete nucleotidice complementare (deci coezive). Dacă se amestecă, ei se unesc prin capetele lor cu ajutorul legăturilor de hidrogen care se formează în baza complementarității nucleotidelor terminale astfel încît capetele cu poli (dA) se unesc cu capetele cu poli (dT), iar în cealaltă alternativă, capetele cu poli (dG) se unesc cu capetele cu poli (dC);

— a doua metodă, des folosită datorită spectrului ei mai larg de aplicare, constă în sinteza chimică a secvențelor de nucleotide (de obicei decameri), specifice locului de interacțiune a enzimelor de restricție cu DNA și legarea (sudarea) lor prin intermediul unor enzime particulare (ligaze) de vehicul sau/și pasager.

II.1.5. Legarea pasagerului de vehicul

Tratamentele anterioare care au creat capete coezive la vehicul și pasager au avut ca scop doar potrivirea corectă și specifică a capetelor celor două molecule. Legăturile de hidrogen între capetele coezive ale vehiculului și ale pasagerului în urma amestecării lor nu sînt suficient de puternice ca să confere moleculei hibride stabilitate față de condițiile fiziologice din celulă. Pentru ca molecula de DNA nou construită din vehicul și pasager să devină o unitate stabilă este necesară legarea (sudarea) capetelor lor prin legături covalente. Aceasta se realizează prin tratarea amestecului de vehicul și pasager cu o DNA ligază, enzimă care are proprietatea de a induce formarea legăturilor covalente între moleculele de DNA. Prin urmare, numai după ce s-a produs sudarea pasagerului de vehicul prin legături covalente, cu ajutorul DNA ligazei, s-a ajuns la o moleculă de DNA recombinant adevărată care, așa cum s-a precizat, prezintă caracteristica principală de a fi rezultatul îmbinării artificiale a două segmente de DNA din specii biologice diferite sau din aceeași specie biologică, dar cu un aranjament particular al segmentelor, aranjament neîntîlnit în natură.

II.1.6. Poziția pasagerului în vehicul

Aspecte fundamentale ale acestui subiect au fost prezentate anterior motiv pentru care aici vom sublinia doar pe cele legate de poziția și exprimarea eficientă a pasagerului în vehicul. Plasarea pasagerului în poziția corectă, față de elementele genetice ale unui operon este obligatorie. Transcrierea și traducerea pasagerului poate fi realizată numai dacă, plasat în vehicul, ordinea secvențelor nucleotidelor sale este în concordanță cu sensul transcrierii și ocupă o poziție în aval de promotorul, operatorul și o genă structurală a unui operon adecvat. Situația este oarecum similară cu aceea a unei benzi de magnetofon, care poate fi ascultată numai atunci cînd este introdusă corect în aparat.

II.1.7. Introducerea și exprimarea DNA recombinant în celule

Odată ce construirea DNA recombinant a fost realizată, acesta este introdus în celulele receptoare adecvate pentru multiplicare. Dacă vehiculul este o plasmidă sau bacteriofagul λ, gazda va fi o tulpină bacteriană (*E. coli*, în principal), în timp ce folosirea DNA din virusul SV40 ca vehicul impune utilizarea unor culturi celulare animale, cum este cultura de celule *CV-1P*. Introducerea DNA recombinant în celulele receptoare adecvate se face prin fenomenul de transformare. Acest fenomen a fost observat pentru prima dată de Griffith (1929) și lămurit la nivel molecular printr-o experiență crucială de către Avery și colab. (1944). Transformarea este fenomenul prin care celulele aflate în stare de „competență" reușesc să accepte ireversibil molecule de DNA izolate de la alte celule și să dobîndească prin aceasta proprietăți noi. Într-o cultură de bacterii receptoare sau într-o cultură celulară nu toate celulele sînt susceptibile de a capta DNA. Celulele care se găsesc într-o stare fiziologică particulară și acceptă DNA străin (DNA recombinant sau DNA transformant) se numesc celule în *stare de competență*. Starea aceasta este condiționată de o serie de factori, printre care amintim anumite faze ale ciclului de diviziune celulară, specia bacteriană, etapa fiziologică de creștere, mediul de cultură. Tratarea celulelor cu Ca^{2+}, de exemplu, determină creșterea substanțială a numărului de celule aflate în stare de competență, motiv pentru care pentru introducerea DNA recombinant în celule se folosește în mod curent acest procedeu.

Descoperirea acestui tratament de către Mandel și Higa (1970) a avut un rol fundamental pentru cercetările de tehnologie a DNA

ecombinant. Aceasta deoarece, pînă la publicarea lucrării lui Mandel și Higa, acizii deoxiribonucleici extrași cu fenol din colifagii temperați λ, *434*, *186* sau *P2* reușeau să infecteze *E. coli* numai în prezența unui „fag ajutător", al cărui rol exact nu era cunoscut (Mandel, 1967). Or, tulpina de *E. coli — K12* (gazda majorității experiențelor cu DNA recombinant) devine competentă pentru a primi DNA din fagii temperați fără folosirea „fagului ajutător", iar competența dobîndită în urma tratamentului cu ionii de Ca^{2+} (ceea ce are ca efect principal mărirea permeabilității peretelui celular al bacteriei) determină mărirea eficienței de pătrundere în celule a moleculelor de DNA, atît liniare cît și circulare.

Odată ce pătrunderea DNA străin în celulele competente a fost facilitată de tratamentul cu ioni de Ca^{2+}, o altă problemă care trebuia rezolvată era aceea de a cunoaște dacă prin transformare se poate introduce DNA recombinant în celulele competente și dacă DNA recombinant odată pătruns, se poate exprima biologic în celulele competente. Rezolvînd această problemă, calea unei noi tehnologii prin care se poate insera și exprima DNA de diferite origini (cromozomal sau plasmidic) într-un vehicul adecvat era deschisă. Problema a fost pentru prima dată rezolvată de către Cohen și colab. (1972 și 1973), prin construirea atît *in vivo*, cît și *in vitro* a unor plasmide bacteriene biologic funcționale (active). Plasmidele construite de acești autori (prin scindarea cu endonucleaze restrictive a plasmidelor parentale și legarea fragmentelor cu DNA-ligază) au fost inserate în *E. coli*, iar prin transformare s-au dovedit a fi repliconi activi, posedînd proprietățile genetice și secvența nucleotidelor caracteristică moleculelor de DNA parentale. Aceste experiențe au dovedit că este posibil să se construiască molecule de DNA recombinant prin inserția specifică a fragmentelor de DNA de diferite origini (izolate din cromozomi de procariote sau eucariote, din elemente extracromozomale etc.) în plasmide bacteriene care au proprietatea de a se replica independent. Aceste molecule recombinante sînt biologic active în momentul în care ele sînt introduse în *E. coli* prin transformare.

Prin urmare, prin transformare, moleculele de DNA recombinant pătrund în celulele receptoare. Moleculele de DNA recombinant fiind purtătoare de informație genetică specifică (proprietăți pe care celula receptoare nu le are) vor specifica prin mecanismele expresiei de mesaj proprietăți noi în celula receptoare. Ceea ce este esențial pentru fenomenul de transformare este faptul că proprietățile noi cîștigate în acest mod rămîn stabile de-a lungul generațiilor, oferindu-se astfel posibilitatea multiplicării după dorință a informației genetice noi introduse.

II.1.8. Clonarea DNA recombinant

Pătrunderea DNA recombinant în celule prin procesul de transformare se face în general cu o eficiență scăzută. De obicei, celulele transformate sînt produse de captarea unei singure molecule de DNA recombinant. Din acest motiv celulele formează cîte o colonie specifică, ce se deosebește de alte colonii generate de alte specii moleculare de DNA. Recunoașterea celulelor transformate de DNA recombinant se bazează în principal pe unele proprietăți ale vehiculului sau, în anumite cazuri, chiar pe cele ale pasagerului.

Vehiculul, de exemplu (posedînd markeri genetici, cum ar fi rezistența la anumite antibiotice), conferă numai celulelor transformate (cele în care a intrat DNA recombinant) posibilitatea să crească în prezența antibioticelor respective. Pe această bază se pot selecționa și clona transformanții obținuți.

Pasagerul poate și el servi la clonarea DNA recombinant. Astfel, introducerea genei β-galactozidazei ca pasager într-un vehicul conferă vehiculului respectiv unele caracteristici proprii acestei enzime. Coloniile generate de DNA recombinant conținînd β-galactozidază devin albastre, spre deosebire de celelalte colonii care nu conțin enzima și care sînt albe.

Este suficient să se izoleze o singură colonie pentru a propaga apoi după dorință celulele respective, pentru a produce DNA recombinant sau produsul pe care îl sintetizează acest DNA artificial.

II.1.9. Identificarea chimică a DNA recombinant

Identificarea celulelor în care se multiplică DNA recombinant este relativ ușoară, deoarece markerii genetici ai vehiculului permit selecționarea celulelor transformate. În schimb, identificarea pasagerului legat de vehicul este mai dificilă, deoarece — așa cum s-a menționat — numai în unele cazuri, cum este cel al β-galactozidazei, pasagerul posedă markeri ușor detectabili. Totuși, există unele metode puse la punct în acest scop; amintim două din cele mai des folosite.

II.1.9.1. **Metoda hibridizării „in situ".** Este metoda cea mai simplă de identificare a DNA recombinant. Ea are particularitatea principală de a permite detectarea secvențelor specifice ale nucleotidelor pasagerului în celulele unei colonii, fără a necesita izolarea DNA din celule; coloniile se imobilizează pe discuri de nitroceluloză, pe care se efectuează apoi testul de hibridizare cu DNA sau RNA radioactiv complementar (Grunstein și Hogness, 1975).

II.1.9.2. Excizia pasagerului din vehicul și analiza secvenței bazelor sale. Această metodă este foarte laborioasă, dar are avantajul că oferă rezultate care permit compararea riguroasă a secvenței nucleotidelor pasagerului excizat cu aceea a secvenței nucleotidelor pasagerului înainte de inserție. La excizia pasagerului din vehicul se ține seama de modul în care el a fost inserat în DNA recombinant, pentru a folosi, pe cît posibil la excizie, calea inversă parcursă la inserție. De regulă se face uz de aceleași enzime de restricție care au fost folosite și la introducerea pasagerului în vehicul. O metodă de excizie a pasagerului este redată la pag. 210. După excizia pasagerului urmează analiza secvenței nucleotidelor sale, ceea ce azi se realizează destul de ușor prin tehnica lui Maxam și Gilbert (1977). Odată ce identitatea celor două secvențe este dovedită prin această metodă, nu mai există nici un dubiu în legătură cu identitatea pasagerului.

II.1.10. Identificarea produsului sintetizat de DNA recombinant

Construcția unui DNA recombinant se face atît în scopuri academice — pentru studiul unor gene, dar mai ales în scopuri practice — pentru a realiza pe cale biologică sinteza avantajoasă a unui anumit produs (proteină, enzimă, hormon etc.) necesar în industrie, medicină sau alimentație. Prin urmare, scopul cercetărilor cu DNA recombinant este atins doar în momentul în care produsul rezultat din această tehnologie este identificabil sau se poate obține în cantitate mai mare și mai economic decît pe cale obișnuită.

Identificarea și analiza produsului sintetizat de DNA recombinant este deci deosebit de importantă, deoarece numai pe baza lor se poate stabili succesul sau insuccesul tehnologiei.

Metodele de identificare folosite sînt în general foarte sensibile și specifice. Identificarea somatostatinei produsă de gena somatostatinei sintetizată chimic (Itakura și colab. 1977) sau a antigenelor specifice virusului hepatitei *B* produse de DNA recombinant conținînd gena hepatitei *B* (Burrell și colab., 1979) s-a făcut cu ajutorul metodei radioimunologice (RIA), cea mai sensibilă metodă existentă pentru dozarea acestor componente. Prin această metodă s-a stabilit că în unele cazuri celulele de *E. coli* purtătoare a DNA recombinant, conținînd gena somatostatinei, conțin 0,3% somatostatină din cantitatea totală de proteină. Etapele principale ale tehnologiei DNA recombinant sînt redate schematic în fig. 7.

După cum se vede în figură prima etapă constă în alegerea și izolarea vehiculului și a pasagerului. Urmează apoi deschiderea vehiculului circular cu o enzimă de restricție. Dacă pasagerul a fost izolat cu aceeași enzimă de restricție atunci capetele vehiculului și ale pasagerului devin coezive, ceea ce permite atașarea perfectă a pasagerului de vehicul.

Legarea covalentă a pasagerului de vehicul se face cu DNA ligază. În urma acestui tratament rezultă un DNA recombinant care este de fapt o moleculă de DNA compusă din două fragmente de DNA (provenite din specii biologice diferite sau chiar din aceeași specie biologică), cu elementele lor genetice aranjate în mod artificial și neîntîlnite în

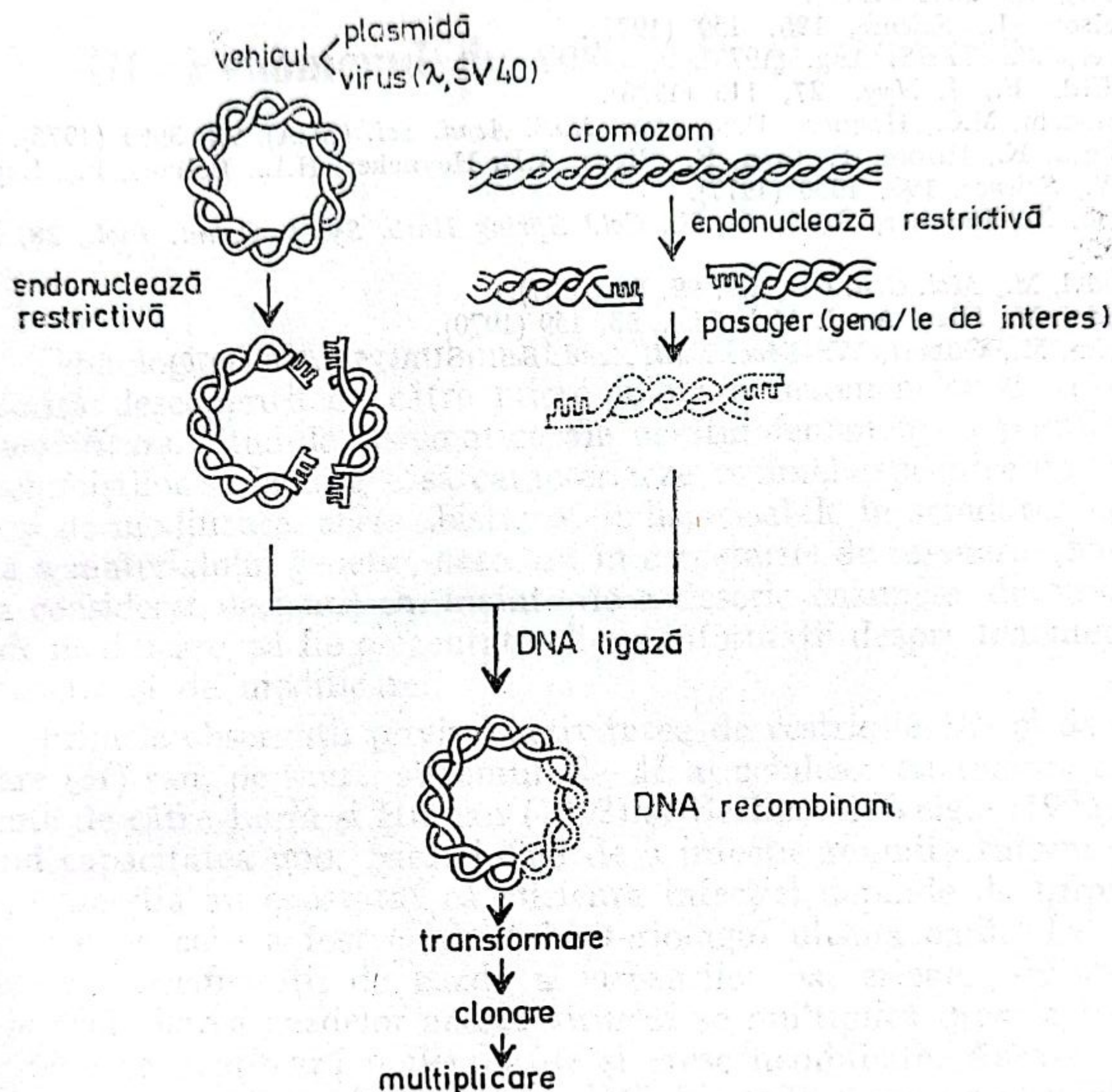


Fig. 7. Tehnologia DNA recombinant.

natură. Pasagerul atașat de vehicul se comportă pasiv; el ajunge sub controlul vehiculului care îl multiplică odată cu multiplicarea sa. Introducerea DNA recombinant în celula-gazdă se face prin transformare. Celulele în care a pătruns DNA recombinant se transformă și dobîndesc proprietăți genetice noi. Coloniile pe care le formează aceste celule sînt recunoscute după proprietățile vehiculului, iar în unele cazuri, după cele ale pasagerului. Fiecare colonie poate fi multiplicată pentru a obține cantitatea dorită de DNA recombinant sau, pe această cale, a produsului biologic a cărui sinteză este dirijată de el.

Bibliografie

1. Avery, O.T., MacLeod, C.M., McCarty, M., *J. Exp. Med.*, **79**, 137 (1944).
2. Burrell, C.J., Mackay, P., Greenaway, P.J., Schneider, P.H., Murray, K., *Nature*, **279**, 43 (1979).
3. Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (SUA), **62**, 2110 (1972).
4. Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W., Helling, R.B., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (SUA), **70**, 3240 (1973).
5. Abelson, J., *Science*, **196**, 159 (1977).
6. Arber, W., *TIBS*, Aug. (1977).
7. Griffith, F., *J. Hyg.*, **27**, 113 (1928).
8. Grunstein, M.C., Hogness, D.S., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (SUA), **72**, 3961 (1975).
9. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D. Heyneker, H.L., Bolivar, F., Boyer, H.W., *Science*, **198**, 1056 (1977).
10. Jacob, F., Brenner, S., Cusin, F., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **28**, 329 (1963).
11. Mandel, M., *Mol. Gen. Genetics*, **99**, 88 (1967).
12. Mandel, M., Higa, A., *J. Mol. Biol.*, **53**, 159 (1970).
3. Maxam, M., Gilbert, W., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (SUA), **74**, 560 (1977).

III. Fenomenul de restricție și modificare

Tehnologia DNA recombinant s-a putut dezvolta în mare măsură datorită descoperirii de către microbiologi a fenomenelor de *restricție* și *modificare.* Studiile sistematice ale acestui fenomen au permis apoi biochimiștilor să izoleze și să caracterizeze enzimele specifice de restricție și de modificare, acele „bisturie" indispensabile în scindarea controlată a materialului genetic, necesară în cercetările de inginerie genetică. S-a considerat deci util ca, înainte de a descrie enzimele de restricție și de modificare, să fie prezentate cîteva informații despre fenomenul de restricție și de modificare.

Primele observații privind activitatea de restricție (*R*) și de modificare (*M*) sau, pe scurt, sistemul *R—M* al celulelor bacteriene au fost făcute de către Luria și Human (1952) și Bertani și Weigle (1953). Studiind capacitatea unor bacteriofagi de a infecta anumite tulpini bacteriene, aceștia au constatat că eficiența infecției depinde de tulpina de bacterie pe care a fost cultivat bacteriofagul ultima oară. În cursul studierii specificității de gazdă a virusurilor bacteriene, s-a observat că la schimbarea gazdelor aceste virusuri se multiplică greu la început, dar apoi se adaptează noilor gazde și cresc neinhibate. Această adaptare — așa-numita *modificare controlată de gazdă* — nu este stabilă din punct de vedere genetic, adică nu implică selecția unui mutant capabil să reproducă infecția. Dimpotrivă, modificarea specifică a virusului se pierde la creșterea pe o altă gazdă, astfel încît la reinfectarea primei gazde numai o mică parte din particulele virale va continua să se multiplice. Fenomenul acesta de întîrziere a creșterii virusului pe noua gazdă se numește *restricție.* Cunoștințele actuale despre restricție și modificare se datoresc însă în principal cercetărilor sistematice efectuate de către Arber și colaboratorii săi.

Astfel, Dussoix și Arber (1962), infectînd bacteria *E. coli* cu ^{32}P-DNA izolat din bacteriofagul λ nemodificat, au observat că acesta este extensiv scindat în cîteva minute după penetrarea lui în celulă.

Analiza ^{32}P-DNA introdus în sistemul celular a arătat că acesta a fost convertit în fragmente de DNA acido-insolubile, oligonucleotide și fosfor anorganic. În urma acestei infecții abortive celulele au supraviețuit. Mai mult chiar, s-a constatat că o parte din produsele de fragmentare a DNA fagic a fost metabolizată de celula-gazdă, iar o altă parte a fost eliminată în mediu.

Deși restricția — așa după cum se va arăta mai departe — este consecința activității unor enzime specifice (de restricție), care realizează numai un număr limitat de fragmentări a DNA nemodificat, în cursul procesului se produce și o degradare a DNA pînă la produși acido-solubili. Pentru acest motiv se consideră că activitatea de restricție se realizează de fapt în două etape principale.

Prima etapă este caracterizată de fragmentarea foarte specifică a DNA nemodificat într-un număr limitat de fragmente, prin ruperea ambelor catene ale dublei elice a DNA. Acest proces este realizat de o enzimă de restricție (Meselson și Yuan, 1968). A doua etapă este mai lentă. În cursul ei se produce digestia nespecifică a DNA de către endonucleaze nespecifice.

Figura 8 explică, printr-un exemplu, restricția și modificarea virusurilor bacteriene, fenomene controlate de gazdă.

Cele două tulpini de *E. coli*, *K* și *C*, sînt gazde naturale ale bacteriofagului λ. Cîtă vreme bacteriofagul λ este cultivat pe aceeași gazdă, în condiții optime, fiecare particulă virală produce prin infecție progeni virali (probabilitatea de formare a plajelor este considerată a fi 1). La schimbarea gazdei se observă următoarele: bacteriofagul λ.*C*, care a crescut pe tulpina *C*, va crește pe tulpina *K* cu o probabilitate de numai 10^{-3}. Noile particule virale formate vor fi λ.*K* și vor cultiva bine

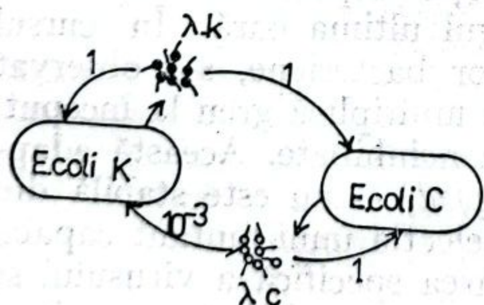


Fig. 8. Exemplu de sistem *R—M* (după *Arber*, 1977)

pe această nouă gazdă. Pe de altă parte, λ.*K* crește de asemenea pe tulpina *C*, dar noii progeni virali devin λ.*C*, nemaifiind capabili să infecteze tulpina *K*. În exemplul de mai sus, tulpina *K* — dar nu și tulpina *C* — are un sistem de restricție și modificare *R—M*. Tulpina *C* acceptă toate virusurile λ, indiferent pe care gazdă au fost crescute anterior. Tulpina *K* acceptă total doar acele virusuri care au fost pasate anterior pe tulpina *K*, suferind modificarea adecvată. Tulpina *K* modifică cel mult $1^0/_{00}$ din virusurile crescute pe *C*.

Procesele moleculare responsabile pentru fenomenele de restricție și modificare au fost elucidate la începutul anilor '60, arătîndu-se că ambele au loc la nivelul DNA, adică la nivelul materialului genetic (Arber și Dussoix, 1962; Dussoix și Arber, 1962). Faptul a fost cu atît mai surprinzător, cu cît se știa că modificarea nu putea fi moștenită. Pentru înțelegerea cît mai deplină a fenomenelor au avut importanță următoarele constatări:

— în situația *R* (de exemplu, infecția tulpinii *K* de *E. coli* cu bacteriofagul λ.*C* — fig. 7), DNA fagic este rapid degradat de către celula-gazdă, care astfel supraviețuiește infecției; aceasta înseamnă că materialul genetic străin celulei a fost distrus în cursul restricției. Pe de altă parte, dacă bacteriofagul λ.*K* este lăsat să se multiplice într-o tulpină nerestrictivă doar în cursul unui singur ciclu, atunci singurii progeni care au prezentat o modificare specifică de tip *K* (adică au fost capabili de infectarea neinhibată a tulpinii *K*) au fost cei în care una dintre catenele DNA progen a provenit de la parental, în cursul replicării semiconservative. Acest fapt arată că în tulpina *K* modificarea acționează direct asupra DNA, fără a împiedica replicarea sa corectă ulterioară și că, mai mult, în cursul replicării principiul modificării rămîne asociat cu catena DNA parental;

— s-a arătat că modificarea se datorează metilării nucleotidelor (Arber, 1965; Kühnlein și Arber, 1972; Smith și colab., 1972); în exemplul de mai sus, discutat aici, al tulpinii *K* (fig. 7), unele resturi de adenină — din secvența nucleotidică specifică pentru o anumită enzimă de restricție — sînt metilate, cu formare de N_6-metiladenină. Această metilare nu modifică conținutul de informație genetică a acidului nucleic și are ca unic rol protecția DNA contra acțiunii endonucleazelor restrictive specifice ale tulpinii *K*.

Pînă în momentul descoperirii și elucidării fenomenului de restricție s-au descris numeroase activități enzimatice care aveau drept țintă DNA, dar corelația acestora cu funcția lor *in vivo* nu a corespuns întotdeauna ca specificitate cu reacția observată *in situ*. O situație cu totul particulară o prezintă, din acest punct de vedere, restricția DNA. Această activitate este realizată de către enzime specifice, denumite *enzime de restricție*, de la fenomenul pe care îl controlează. Ele sînt singurele enzime endonucleolitice a căror activitate *in situ* reflectă atît ca specificitate, cît și ca mărime, activitatea lor *in vivo* (Arber și Linn, 1969). Prin urmare, cînd o bacterie este invadată de un virus necunoscut de ea (nemodificat), se va apăra împotriva acestuia cu ajutorul enzimelor sale de restricție, care au rolul de a scinda molecula de DNA viral, pe care astfel o inactivează. În acest caz se spune că virusul a suferit un proces de **restricție**.

S-a observat însă că, după unul sau mai multe pasaje ale virusului pe aceeași gazdă bacteriană, un număr mic de particule virale „scapă" procesului de restricție. Mai mult chiar, studiul acestor particule a scos

în evidență că ele se pot multiplica cu mare eficiență, fără să mai sufere procesul de restricție. Această multiplicare a devenit posibilă deoarece virusul s-a „modificat" în contact cu noua gazdă. În ce constă însă modificarea? Analiza mecanismului molecular de modificare a bacteriofagului (virusului) λ a arătat că acest fenomen este controlat de celula-gazdă și constă de fapt în metilarea enzimatică a DNA viral. S-a constatat că activitatea de modificare — metilare enzimatică în locuri specifice ale moleculei de DNA — este primul caz de metilare a DNA cu funcție cunoscută și că prin aceasta dispunem de un instrument foarte prețios de marcare a DNA într-o manieră controlabilă, fără a afecta cu nimic mesajul lui genetic (Terzi și Levintal, 1963).

O serie de autori, printre care Gough și Lederberg (1966) și Mamelak și Boyer (1970), au arătat însă că nu toate bazele metilate din DNA și nu toate metilazele din bacterii sînt implicate în procesul de modificare controlată de gazdă.

Activitatea de restricție nu poate fi disociată de activitatea de modificare. Exprimarea proprietăților mai multor tulpini bacteriene (mai ales de *E. coli*) a arătat că fiecare tulpină bacteriană este purtătoarea unui set de activități de restricție și de modificare, iar genele care codifică producerea lor se localizează pe cromozomul bacterian (Arber și Linn, 1969). Cu alte cuvinte, determinanții genetici pentru producerea activităților de restricție și de modificare se găsesc în celulele-gazdă. Acest fenomen a fost pus în evidență, în special, în celulele de *E. coli* *K*12 și *B* (Arber și Linn, 1969), dar și în celulele de *Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium*, precum și în alte bacterii (Meselson și colab., 1972). Nu se știe dacă sisteme asemănătoare există și în organismele superioare. Important este însă că endonucleazele restrictive bacteriene pot scinda DNA din virusuri animale și chiar din celule animale, fapt dovedit pentru prima oară de către Danna și Nathans (1971), ceea ce a permis utilizarea enzimelor bacteriene pentru a produce ruperi specifice în moleculele de DNA de origine animală, atît în scopul cartării cromozomilor, cît și pentru folosirea fragmentelor de DNA pentru cercetările de inginerie genetică.

III.1. Caracteristicile generale ale sistemului de restricție și modificare

După Bertani și Weigle (1953) și Meselson și colab. (1972), sistemele de restricție și modificare prezintă următoarele caracteristici generale:

— bacteria poate avea una sau mai multe specificități de restricție și modificare, determinate genetic. Astfel, DNA care pătrunde într-o celulă avînd specificitatea de restricție r_1 va fi degradat dacă derivă din celule lipsite de specificitatea de modificare de tip m_1;

— tulpini bacteriene cu o specificitate de restricţie r_1 au în mod obligatoriu o specificitate de modificare m_1. Această condiţie este întotdeauna respectată, pentru că ea determină protecţia DNA propriu celulelor faţă de sistemul celular de restricţie respectiv. De exemplu, bacteriofagul λ cultivat pe tulpina de *E. coli K* formează eficient plaje

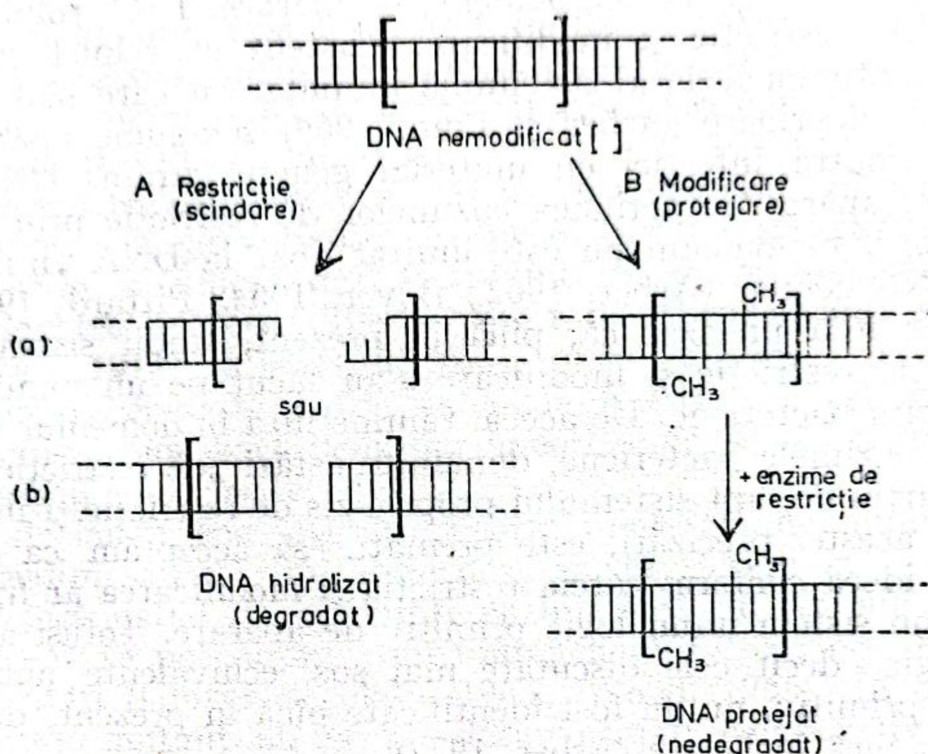


Fig. 9. Schema generală a fenomenului de restricţie şi modificare.

pe tulpini *K*, deoarece acestea au specificităţile de restricţie şi modificare r_K şi respectiv m_K;

— atunci cînd o tulpină are mai mult decît un sistem de restricţie şi modificare, fiecare sistem funcţionează independent, după regulile menţionate mai sus. Trebuie precizat că există însă şi unele tulpini, cum este cazul tulpinii *E. coli C*, care par a fi lipsite de sisteme de restricţie şi modificare.

În fig. 9 sînt reprezentate schematic cele două fenomene, de restricţie şi modificare.

III.2. Rolul biologic major al restricţiei şi modificării

Încă de la începutul studiului fenomenului de restricţie şi modificare s-a pus întrebarea: care este rolul său biologic? Multiplele rezultate acumulate în urma cercetărilor care s-au făcut asupra acestui fenomen au condus la concluzia principală că restricţia şi modificarea

controlate de celulele bacteriene ar fi, de fapt, un sistem unic de apărare a celulei față de agenți virali străini. Ca rezultat al acțiunii acestui sistem, un DNA viral străin — intrat în celulă — este specific identificat și apoi inactivat. Mecanismul este extrem de operativ față de un virus străin care a pătruns în mediu și față de care populația bacteriană nu și-a construit încă un echipament de apărare. Deci, rolul major al sistemului de restricție și modificare, existent în celulele bacteriene, ar fi asemănător cu acela al sistemului imunitar cu care sînt înzestrate organismele superioare (Arber și Linn, 1969) și anume apără celulele purtătoare contra infecției cu material genetic străin. DNA celular propriu este apărat de acțiunea enzimelor de restricție prin metilarea de modificare. Fenomenul nu este limitat doar la DNA viral, ci afectează și DNA celular (Arber, 1962; Boyer, 1964; Pittard, 1964).

Trebuie însă precizat că, pînă în prezent, studii sistematice ale sistemului de restricție și modificare s-au făcut pe un număr relativ mic de tulpini bacteriene. De aceea, rămîne încă în domeniul speculativ dacă toate enzimele bacteriene, denumite astăzi „de restricție și modificare", aparțin de fapt sistemului propriu-zis de restricție și modificare. În lumina acestei precizări, este prematur să acceptăm ca definitivă și generală ideea conform căreia restricția și modificarea ar fi, la toate bacteriile, un sistem imunologic primitiv de apărare. Totuși alte funcțiuni biologice decît cele discutate mai sus, echivalente unui sistem imunologic primitiv, nu au fost identificate pînă în prezent, dar discuțiile nu sînt încă încheiate (Arber, 1977).

Sistemul de restricție și modificare ar putea avea deci și alte roluri importante în menținerea echilibrului ecologic, în care bacteria este confruntată cu diferite condiții de creștere și unde ea trăiește în populații mixte, cu o mare varietate de alte tulpini bacteriene și bacteriofagi. În acest caz, sistemul de restricție și modificare ar funcționa ca un sistem organizat de apărare față de invazia unui DNA străin, iar tulpinile avînd un sistem eficient de restricție ar avea o șansă mai mare de supraviețuire într-o nișă ecologică particulară (Arber, 1977).

Un alt rol posibil al sistemului de restricție și modificare ar fi acela de a oferi semnale specifice pe molecula de DNA necesare replicării sau transcrierii DNA. Întrucît mutanții deficienți în sistemul de restricție și modificare prezintă aceleași caracteristici de creștere ca și tulpinile parentale, rezultă că acest rol este puțin probabil să fie operativ.

În schimb, este mult mai posibil ca sistemul de restricție și modificare să aibă un rol important în procesele de recombinare și reparație. Așa cum se va arăta mai departe, enzimele de restricție sînt utilizate pentru fragmentarea specifică a DNA *in vitro*, pentru a obține apoi molecule de DNA recombinant cu ajutorul DNA ligazei. Or, dacă acest lucru este posibil în eprubetă, se pune întrebarea: de ce nu s-ar produce același proces și în natură? De regulă fragmentarea se produce însă asupra DNA heterolog. În plus, este greu de înțeles de ce celula

ar avea motive să recombine două fragmente de DNA de diferite origini. Cum însă atît recombinarea, cît și repararea DNA nu sînt total lămurite, ipoteza rolului sistemului de restricție și modificare în aceste procese nu trebuie totuși abandonată.

Prin urmare, în momentul de față, este greu de dat un singur răspuns clar la întrebarea privind funcția biologică exactă a sistemului de restricție și modificare la bacterii. Ar fi posibil să existe chiar mai multe răspunsuri la această întrebare. După cum precizează Arber (1977) modelul imunologic ar putea fi satisfăcător, cu toate că el are dezavantajul de a nu fi ușor de dovedit.

Pînă în prezent, sistemele *R—M* au fost detectate neechivoc doar la bacterii, într-o largă varietate de specii. Studiile sistematice au fost însă restrînse la un număr mic de tulpini: *E. coli* și *Enterobacteriaceae* înrudite, *Bacillus subtilis*, diverse tipuri de *Pseudomonas* și *Haemophilus* (Boyer, 1971; Roberts, 1976).

Informația genetică pentru sistemele *R—M* este cel mai adesea stocată în cromozomii bacterieni, dar uneori se poate găsi și în plasmide sau în genomul unor bacteriofagi.

Tulpinile bacteriene sălbatice conțin unul sau mai multe sisteme *R—M*, înrudite sau nu; de asemenea, există tulpini în care nu s-au identificat încă astfel de activități enzimatice. Din tulpini conținînd sisteme *R—M* se pot obține prin mutageneză tulpini noi, lipsite de aceste activități (Glover și colab., 1963; Wood, 1966). În condiții de laborator acești mutanți nu par a fi dezavantajați, comparativ cu parentalii, dar mai mult ca sigur că lucrurile sînt diferite în sistemele ecologice naturale.

Eficacitatea unui sistem *R—M* față de un genom străin depinde de faptul dacă genomul este sau nu sensibil la sistemul considerat; aceasta presupune existența prezenței unor centri specifici de recunoaștere pe molecula de DNA față de un sistem *R—M*. În cazul unor molecule mici de DNA (de exemplu, genomul unor bacteriofagi) s-ar putea ca să nu existe nici un centru de recunoaștere sau să existe unul singur. În cazul existenței unui singur centru, sensibilitatea la restricție se poate pierde prin mutația unui singur nucleotid din secvența de recunoaștere (Arber și Kühnlein, 1967). În acest mod se poate face și maparea genetică a centrului de recunoaștere. Dealtfel, din punct de vedere istoric, acest tip de experiment a dus la constatarea centrilor de recunoaștere în reacțiile enzimatice de tip *R—M* (Arber și Linn, 1967).

III.3. Enzime de restricție

Pînă în prezent s-au descris numeroase enzime (peste 150) implicate în fenomenul de restricție și modificare, iar numărul lor este în continuă creștere. În ciuda existenței unui număr așa de mare de enzime de

restricţie şi modificare, ele pot fi grupate după mecanismul lor de acţiune în fenomenul de restricţie (Boyer, 1971) în trei tipuri principale:

a) *enzime de restricţie şi modificare de tip I* sau *sisteme enzimatice R—M I*; cuprinde enzimele de restricţie care acţionează numai în prezenţa unor cofactori, cum ar fi S-adenozilmetionina (SAM) şi acidul adenozintrifosforic (ATP). Aceste enzime au proprietatea de a fragmenta DNA bicatenar într-o anumită secvenţă de nucleotide, diferită de secvenţa de nucleotide folosită de enzimă pentru recunoaşterea substratului (Meselson şi Yuan, 1968; Linn şi Arber, 1968);

b) *enzime de restricţie şi modificare de tip II* sau *sisteme enzimatice R—M II*; cuprinde enzime care acţionează în absenţă de cofactori (SAM, ATP) şi clivează DNA bicatenar în interiorul secvenţei nucleotidice de recunoaştere pentru enzimă;

c) *enzime de restricţie şi modificare de tip III* sau *sisteme enzimatice R—M de tip III*; foarte recent s-a propus introducerea unui al treilea tip de enzime, care le cuprinde pe acelea a căror activitate este doar stimulată de SAM, fără să aibă neapărată nevoie de prezenţa lui. Întrucît acest tip enzimatic are un număr restrîns de reprezentanţi şi caracterizarea lui nu este încă suficientă, se vor prezenta doar cîteva date privind caracteristicile sale.

După cum se poate remarca cu uşurinţă, clasificarea nu ţine cont de activitatea de modificare prezentată de sistemele respective. În principal, pentru motivul că activitatea de modificare are la bază unul şi acelaşi proces chimic de metilare a DNA, promovat de enzimele avînd această activitate.

Trebuie însă precizat că în sistemul *R—M* de tip I cele două activităţi pot fi exercitate de aceeaşi enzimă; ea acţionează ca restrictază atunci cînd are toate subunităţile şi se comportă exclusiv ca enzimă de modificare atunci cînd pierde o anumită subunitate. Situaţia este total diferită în sistemele *R—M* de tip II, unde cele două activităţi sînt grefate pe două suporturi proteice diferite.

În general, endonucleazele restrictive — alături de o serie de endonucleaze nespecifice — sînt implicate în scindarea hidrolitică a legăturilor fosfodiesterice din acizii deoxiribonucleici. Conform normelor Comisiei de Enzimologie a Uniunii Internaţionale de Biochimie (I.U.B.) esterazele care hidrolizează diesterii fosforici formează sub-subclasa *E.C.* 3.1.4.

În continuare vor fi prezentate cîteva date asupra enzimelor de restricţie, atît din punct de vedere al structurii, cît şi al proprietăţilor şi al mecanismelor de acţiune asupra duplexului de DNA.

Întrucît despre endonucleazele restrictive de tip II se cunosc mai multe date în ceea ce priveşte mecanismul lor de acţiune, pe de o parte, şi deoarece sînt din ce în ce mai mult utilizate în tehnologia DNA recombinant, precum şi în determinarea secvenţelor de DNA, pe de altă parte, prezentarea va începe cu aceste enzime.

III.3.1. Sisteme *R-M* de tip II

Endonucleazele restrictive de tip II au jucat și joacă un rol deosebit în dezvoltarea tehnologiei DNA recombinant, cu toate că dintre numeroasele enzime cunoscute doar două — Eco *R*I și Hin*d* II — au fost utilizate extensiv; în ultima vreme și alte enzime restrictive și-au găsit locul în arsenalul acestei tehnologii biochimice a viitorului.

III. 3.1.1. **Clasificarea enzimelor de restricție de tip II în funcție de structura centrului de recunoaștere.** Clasificarea enzimelor de restricție de tip II s-a făcut în funcție de numărul de baze care intră în secvența de recunoaștere, reprezentată de un *palindrom*. Se deosebesc trei grupe de enzime de restricție tip II cu patru, cinci și, respectiv șase nucleotide implicate în procesul de recunoaștere (tabelul 1).

În cadrul fiecărei grupe există diferențe între produsele de clivare a duplexului de DNA. Astfel, în grupul de enzime de restricție care recunosc secvențe tetranucleotidice sînt incluse atît enzime care duc la apariția de *capete netede* sau *tocite (flush, blunt* sau *smooth ends)* (capete cu secvențe nucleotidice complementare complete; de exemplu, Hae III), cît și enzime care duc la apariția de *capete coezive* sau *lipicioase (cohesive ends)* (capete cu secvențe nucleotidice mai lungi în sensul 3', de exemplu Hha I sau în sensul 5', de exemplu Hpa II sau Mbo I). Mai mult chiar, unele enzime, cum ar fi endonucleaza restrictivă Hin*f* I, recunosc o secvență nucleotidică variabilă.

Calculul probabilităților arată o frecvență de apariție întîmplătoare a palindromului tetranucleotidic odată la 256 perechi de baze, ceea ce face ca în urma clivării duplexului de DNA cu enzime de restricție care au în situsul de recunoaștere secvențe tetranucleotidice să apară fragmente moleculare mai mici. Fac excepție de la regulă enzimele Hha I și Hpa II, care rup DNA din celulele eucariote cu o frecvență mult mai mică decît cea calculată, aceasta probabil datorită faptului că DNA din eucariote are o proporție relativ redusă de dinucleotide CG, care se află în centrul de recunoaștere al acestor enzime.

Tot o excepție o constituie și enzima de restricție Dpn I, care recunoaște tetranucleotidul GATC numai dacă este modificat, constituind — pînă în prezent — singura endonuclează restrictivă absolut dependentă de DNA modificat. În același timp se cunoaște și Dpn II, care recunoaște și atacă aceeași secvență ca și Dpn I, dar nemodificată.

Se cunosc deocamdată puține endonucleaze restrictive care să recunoască secvențe pentanucleotidice. Dintre acestea, enzimele Hph I și Mbo II au o comportare puțin mai neobișnuită și anume secvențele pe care le recunosc nu prezintă nici un element de simetrie și, în plus,

ruperea duplexului de DNA are loc la distanță de centrul de recunoaștere, după opt perechi de baze.

Cele mai numeroase enzime de restricție de tip II studiate, recunosc palindroame hexanucleotidice, dar și aici se remarcă o mare varietate, atît în tipul secvenței de recunoaștere, cît și în tipul de „capete" pe care îl produc la hidroliză (netede sau coezive). Astfel, Hpa I „taie" secvența GTT.AAC eliberînd capete netede, în timp ce Bam I și Pst I formează capete coezive, cu extensie în sensul 5′ și, respectiv 3′. De asemenea, s-a constatat că enzimele provenind din *Haemophilus influenzae* serotip *d* (Hin*d* II) sau *Haemophilus aegyptius* (Hae I, Hae II) nu reclamă o specificitate absolută a bazelor din secvențele lor de recunoaștere, putînd deci ataca cîteva secvențe hexanucleotidice diferite în zona lor centrală, dar identice în zonele lor periferice.

Analizînd tabelul 1 se poate constata că există numeroase asemănări între secvențele atacate de enzime care recunosc situsuri tetranucleotidice și cele care recunosc situsuri hexanucleotidice. De exemplu, Mbo I recunoaște secvența . GATC, în timp ce specificitatea Bam I și Bgl I merge mai departe, ele recunoscînd secvențele hexanucleotidice G.GATCC și, respectiv A.GATCT. Același paralelism se poate observa și între Hae III (GG. CC) și Bal I (TGG. CCA) sau între Alu I (AG.CT) și Hin*d* III (A.AGCTT). Pentru aceste enzime Roberts a introdus termenul de *izoschizomeri*.

Tabelul 1

Endonucleaze* specifice și secvențele lor de recunoaștere (după Roberts, 1977)

Tetranucleotide		Pentanucleotide		Hexanucleotide	
Alu I	A G. C T T C. G A	Eco *R*II	.C C$\left(^{A}_{T}\right)$G G G G $\left(^{T}_{A}\right)$ C C	Ava I	C. Py C G Pu G G Pu G C Py. C
Hae III	G G. C C C C. G G	Hph I	G G T G A C C A C T→ →8 perechi baze	Bam I	G. G A T C C C C T A G. G
Hha I	G C G. C C. G C G	Mbo II	G A A G A C T T C T→ →8 perechi baze	Bgl II	A. G A T C T T C T A G. A
Hpa II	C. C G G G G C. C			Bal I	T G G. C C A A C C. G G T
Mbo I	.G A T C C T A G.			Eco *R*I	G. A A T T C C T T A A. G
Taq I	T. C G A A G C. T			Hin*d* III	A. A G C T T T T C G A. A
Hin*f* I	G. A(N) T C C T(N) A. G			Hpa I	G T T. A A C C A A. T T G

Tetranucleotide		Pentanucleotide	Hexanucleotide	
Dpn I	.G A T C C T A G. (numai modificat)		Pst I	C T G C A. G G. A C G T C
Dpn II	.G A T C C T A G.		Xma I	C. C C G G G G G G C C. C
			Hae I	(A/T) G G. C C(T/A) (T/A) C C. G G(A/T)
			Hae II	Pu G C G C. Py Py. C G C G Pu
			Hind II	G T Py. Pu A C C T Pu. Py T G

* Denumirile au fost propuse de către Smith și Nathans (1973); enzimele de restricție sînt desemnate prin prima literă a denumirii genului bacteriei, urmată de primele două litere ale denumirii speciei. Celelalte litere sau cifre indică fie tulpina din care s-a izolat enzima, fie ordinea descoperirii mai multor activități în aceeași tulpină.

[1] Punctul indică locul ruperii duplexului polinucleotidic. Alu I din *Arthrobacter luteus* (Roberts și colab., 1976b); Hae I, Hae II, Hae III din *Haemophilus aegyptius* (Middleton și colab., 1972; Roberts și colab., 1975); Hha I din *Haemophilus haemolyticus* (Roberts și colab., 1976a); Hpa I, Hpa II din *Haemophilus parainfluenzae* (Garfin și Goodman, 1974; Sharp și colab., 1973); Mbo I, Mbo II din *Moraxella bovis*; Taq I din *Thermus aquaticus*; Hin*f* I din *Haemophilus influenzae* serotip *f*; Dpn I, Dpn II din *Diplococcus pneumoniae* (Lacks și Greenberg, 1973); Eco *R*I, Eco *R*II din *Escherichia coli* (Bigger și colab., 1973; Boyer și colab., 1973; Greene și colab., 1976; Hedgpeth și colab., 1972); Hph I din *Haemophilus parahaemolyticus* (Kleid și colab., 1976); Ava I din *Anabaena variabilis* (Murray și colab., 1976); Bam I din *Bacillus amyloliquefaciens H* (Wilson și Young, 1975); Bgl II din *Bacillus globigii;* Bal I din *Brevibacterium albidum;* Hin*d* II, Hin*d* III din *Haemophilus influenzae* serotip *d* (Kelly și Smith, 1970; Old și colab. 1975; Smith și Wilcox, 1970); Pst I din *Providencia stuartii* (Smith și colab., 1976; Brown și Smith, 1976); Xma I din *Xanthomonas malvacearum.*

N (din secvența pentru Hin*f* I) poate fi orice nucleotid.

Au mai fost caracterizate și alte endonucleaze specifice, cu toate că secvențele lor de recunoaștere nu au fost încă stabilite (tabelul 2).

Aceste enzime au fost studiate deoarece se găsesc în cantități destul de mari în celulele bacteriene și, în plus, s-au putut purifica cu destulă ușurință. Astfel, de exemplu, Mnl I care recunoaște probabil un tetranucleotid produce ruperea DNA din SV40 sau din bacteriofagul ØX174 în numeroase fragmente. Numărul mare de fragmente pe care îl dă la ruperea DNA din bacteriofagul λ sau din adenovirusul 2 enzima Hga I sugerează că ea are un situs de recunoaștere tetra- sau pentanucleotidic. Hga I nu reușește să cliveze DNA din SV40, probabil deoarece

Tabelul 2

Endonucleaze specifice parțial caracterizate (după Roberts, 1977)

Enzima	Proveniența	Frecvența de rupere a DNA		
		λ (50 000 perechi baze)	Ad–2 (38 000 perechi baze)	SV40 (5 000 perechi baze)
Bgl I	*Bacillus globigii*	22	12	1
Blu I	*Brevibacterium luteum*	1	7	0
Hga I	*Haemophilus gallinarum*	>30	>30	0
Kpn I	*Klebsiella pneumoniae*	2	8	1
Mnl I	*Moraxella nonliquefaciens*	>50	>50	>10
Sac I	*Streptomyces achromogenes*	2	>7	0
Sac II	*Streptomyces achromogenes*	3	>20	0
Sal I	*Streptomyces albus G*	2	3	0
Xba I	*Xanthomonas badrii*	1	4	0

enzima ar necesita în centrul de recunoaștere prezența dinucleotidului CG, rar întîlnit în DNA din eucariote, iar DNA de SV40 se comportă, din acest punct de vedere, ca DNA din eucariote.

DNA din adenovirusul de tip 2 sau din bacteriofagul λ mai sînt hidrolizați în numeroase fragmente și de către alte enzime de restricție, cum ar fi Hpa II, Hha I, Taq I, la care s-a dovedit deja existența secvenței tetranucleotidice la situsul de recunoaștere.

Despre celelalte endonucleaze specifice se știu relativ puține lucruri. De exemplu, s-a stabilit că Sal I, la fel ca și numeroase alte enzime de restricție, produce capete coezive (tabelul 3), dar nu se cunoaște nici secvența, nici extensia lor.

Tabelul 3

Enzime care formează capete coezive (după Roberts, 1977)

Enzima	Secvența	Enzima	Secvența
Bam I	G. G A T C C C C T A G. G	Hpa II	C. C G G G G C. C
Bgl II	A. G A T C T T C T A G. A	Pst I	C T G C A. G G. A C G T C
Eco *R*I	G. A A T T C C T T A A. G	Taq I	T. C G A A G C. T
Eco *R*II	.C C (A/T) G G G G (T/A) C C.	Xma I	C. C C G G G G G G C C. C
		Sal I	?

Tabelul 3 (continuare)

Enzima	Secvența	Enzima	Secvența
Hae II	Pu G C G C. Py Py. C G C G Pu	Mbo I	.G A T C C T A G.
Hha I	G C G. C C. G C G	Eco *RI**[1]	.A A T T T T A A.
Hin*d* III	A. A G C T T T T C G A. A	Hin*f* I	G. A (N) T C C T (N)A.G

[1] Eco *RI** constituie o variantă defectivă a Eco *RI*, care se pune in evidență atunci cind se lucrează în condiții anormale de *p*H și de tărie ionică (Polisky și colab., 1975).

Din numărul mare de endonucleaze de restricție de tip II izolate, unele au fost mai bine caracterizate, în sensul că au fost descifrate atît palindroamele din situsul de recunoaștere, cît și numărul de fragmente nucleotidice formate prin acțiunea acestor enzime asupra anumitor specii de DNA, folosite ca substrat (tabelul 4).

Tabelul 4

Caracterizarea unor endonucleaze de restricție (după Tiollais și Rambach, 1977)

Proveniența	Denumire enzimă	Secvență de recunoaștere	Extremități produse	Număr tăieturi DNA		
				λ	Ad-2	SV40
*E.coli RY*13 (cu plasmida *RTF*1)	Eco *RI*	5′-GAATTC- -CTTAAG-3′	5′pAATTC- G-	5	5	1
*E.coli R*245	Eco *RII*	-CC (A/T) GG- -GG (A/T) CC-	pCCTGG- sau- pCCAGG-	35	35	16
Haemophilus influenzae (serotip *d*)	Hin*d* II	-GTPyPuAC- -CAPuPyTG-	pPuAC- PyTG-	34	20	7
	Hin*d* III	-AAGCTT- -TTCGAA-	pAGCTT- A-	6	11	6
Haemophilus parainfluenzae	Hpa I	-GTTAAC- -CAATTG-	pAAC- TTG-	11	6	4
	Hpa II	-CCGG- -GGCC-	pCGG- C-	>50	>50	1
Haemophilus aegyptius	Hae III	-GGCC- -CCGG-	pCC- GG-	>50	>50	18
Bacillus amyloliquefaciens H	Bam I	-GGATCC- -CCTAGG-	pGATCC- G-	5	3	1
Bacillus globigii	Bgl II	-AGATCT- -TCTAGA-	pGATCT- A-	5	10	–
Serratia marcescens S	Sma I	-CCCGGG- -GGGCCC-	pGGG- CCC-	3	12	–
Xanthomonas malvacearum	Xma I	-CCCGGG- -GGGCCC-	pCCGGG- C-	3	12	–

Se constată că unele tulpini bacteriene conțin două endonucleaze, de exemplu Hin*d* II și Hin*d* III din *Haemophilus influenzae* serotip *d*, cu specificitate diferită, în timp ce unele enzime extrase din bacterii diferite au aceeași specificitate a centrului de recunoaștere și dau și aceeași tăietură (Bam I și Bst I din *Bacillus stearothermophilus*). Endonucleazele de restricție Sma I și Xma I recunosc același centru, dar clivează palindromul în mod diferit, formînd capete netede și, respectiv capete coezive, pe cînd Bam I și Bgl I recunosc centri diferiți, dar dau aceeași tăietură.

III.3.1.2. **Determinarea secvenței nucleotidice din DNA în situsul de recunoaștere al endonucleazelor de restricție.** Pentru înțelegerea mecanismului fenomenului de restricție și pentru a putea utiliza acest fenomen în funcție de necesitățile tehnologiei DNA recombinant, o importanță deosebită o prezintă cunoașterea secvențelor specifice pentru diferite endonucleaze de restricție. De obicei, descifrarea secvențelor implicate în procesul de restricție determinat de enzimele de tip II se face după următoarea schemă generală: capătul 5'-fosforil al produselor de hidroliză se marchează cu ^{32}P cu ajutorul polinucleotidkinazei (Weiss și Richardson, 1967), iar apoi produșii se analizează prin procedee cromatografice și electroforetice. Prin analiza „celui mai apropiat vecin" *(nearest neighbour)* se deduce apoi secvența nucleotidică terminală. În ceea ce privește capătul 3'-hidroxil al fragmentelor rezultate prin restricție, cu mici excepții — de exemplu pentru enzima Hin*d* II (Kelly și Smith, 1970) — nu li s-a determinat secvența.

În continuare se prezintă modul în care Kelly și Smith (1970) au realizat descifrarea secvenței situsului de recunoaștere și de rupere în cazul particular al endonucleazei de restricție Hin*d* II.

A. *Determinarea secvenței nucleotidice la capătul 5'.* Pentru determinarea secvenței nucleotidice la capătul 5'-terminal rezultat după hidroliza DNA din fagul *T7* cu enzima de restricție Hin*d* II s-a procedat după cum urmează: DNA fagic s-a marcat uniform cu ^{33}P și s-a supus acțiunii de restricție a enzimei Hin*d* II. Grupările 5'-fosforil apărute în urma hidrolizei au fost îndepărtate prin tratare cu o altă enzimă și anume cu fosfatază alcalină. La capetele 5'-terminale defosforilate au fost transferate cu ajutorul polinucleotidkinazei grupări ^{32}P-fosforil din γ-^{32}P-ATP. Noile produse, dublu marcate cu ^{33}P și ^{32}P, au fost hidrolizate cu diverse nucleaze, iar fragmentele ^{32}P-marcate izolate prin diverse procedee au fost caracterizate prin electroforeză, cromatografie pe DEAE-celuloză și prin alte metode. În acest mod,

pentru enzima de restricţie Hin*d* II s-a stabilit existenţa la capătul 5'-fosfat a unei secvenţe pPupApC (fig. 10).

B. *Determinarea secvenţei nucleotidice la capătul 3'.* Şi pentru determinarea secvenţei 3'-terminale, DNA din bacteriofagul *T7* uniform

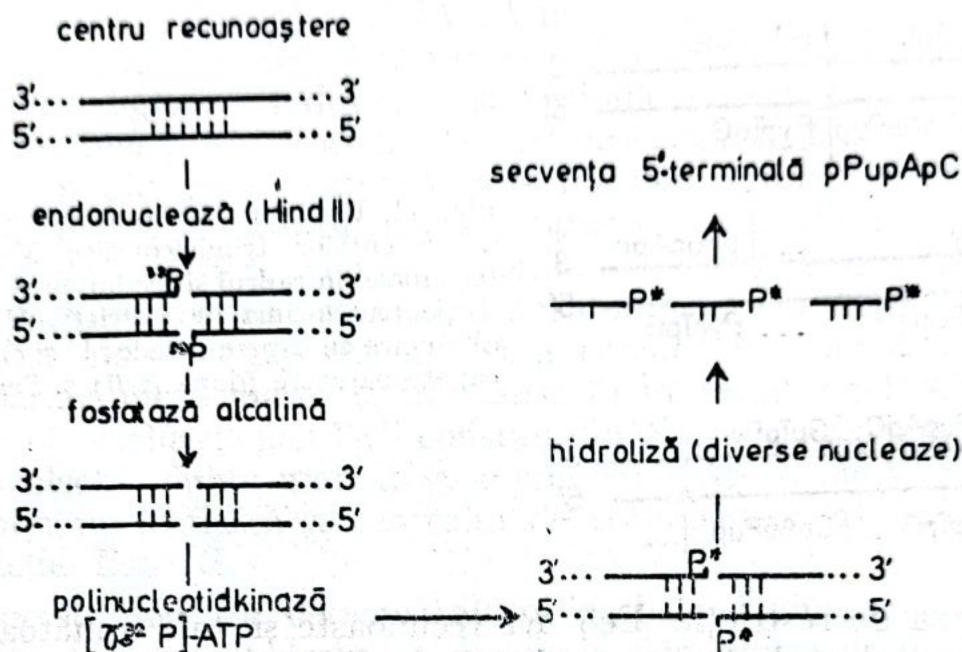
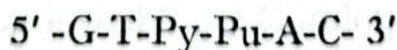


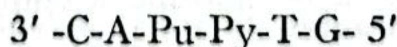
Fig. 10. Etapele principale ale determinării secvenţei nucleotidice la capătul 5' (după *Kelly* şi *Smith,* 1970).

marcat cu ^{32}P a fost hidrolizat cu endonucleaza de restricţie Hin*d* II. Produsele rezultate la această primă scindare s-au incubat în continuare cu nucleaza din *Micrococcus lysodeicticus*; după hidroliză s-au format grupări terminale 3'-fosforil şi 5'-hidroxil. În aceste condiţii, circa 50% din DNA iniţial se rupe la nucleozid-3'-fosfaţi şi dinucleozid-3'-fosfaţi. Capetele 5'-terminale ale DNA vor forma compuşi de tip pXp şi pXpYp, iar cele 3'-terminale formează compuşi XpX şi nucleozide. După cromatografie pe DEAE-celuloză, dinucleozidmonofosfaţii s-au separat prin electroforeză, iar speciile rezultate au fost analizate în continuare prin hidroliză cu fosfodiesteraza din veninul de şarpe, comparativ cu fosfodiesteraza din splină. În acest mod, s-a determinat secvenţa de la capătul 3'-terminal şi anume GpTpPy.

S-au imaginat trei cazuri posibile de aranjare reciprocă a celor două secvenţe trinucleotidice determinate (fig. 11).

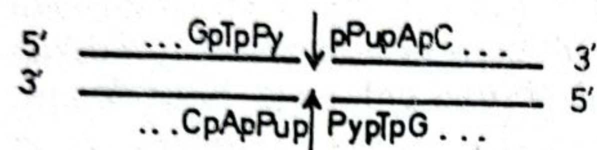
Rezultatele obţinute erau de aşteptat pentru cazul a). Deci secvenţa nucleotidică a centrului de recunoaştere al enzimei de restricţie Hin*d* II conţine şase perechi de baze şi anume:

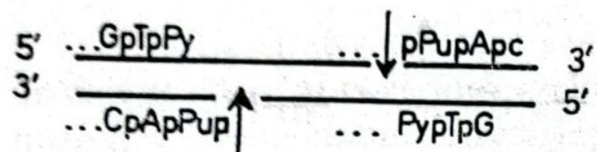

5' -G-T-Py-Pu-A-C- 3'


3' -C-A-Pu-Py-T-G- 5'

Prin metode similare s-au stabilit și secvențele nucleotidice din situsul de recunoaștere al altor enzime de restricție.

III.3.1.3. Demonstrarea identității secvenței de recunoaștere, clivare și modificare pentru sistemele *R—M* de tip II. Anterior s-a arătat că





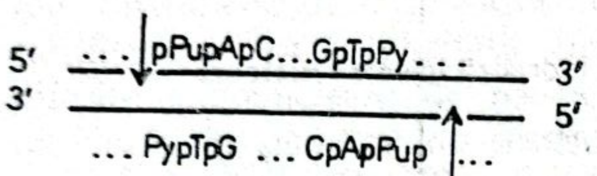
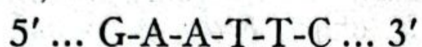


Fig. 11. Posibilitățile de aranjare reciprocă a secvențelor trinucleotidice 3'— și 5'—terminale în cadrul situsului de recunoaștere pentru enzima de restricție Hin*d* II: a) clivare cu capete netede; b) și c) clivare cu capete oarecare (după *Kelly* și *Smith*, 1970).

endonucleaza de restricție Eco *R*I recunoaște și taie următoarea secvență hexanucleotidică din duplexul de DNA:





Or, aceeași secvență o recunoaște și metilaza de modificare corespunzătoare, după cum au demonstrat Dugaiczyk și colab. (1974), printr-un experiment de mare eleganță, pe care îl redăm în continuare. Ca substrat s-a utilizat DNA de SV40, care prezintă o moleculă circulară covalentă închisă (*CCI*), cu un singur situs de recunoaștere pentru endonucleaza de restricție Eco *R*I. Prin acțiunea enzimei asupra acestui DNA a rezultat — datorită unei singure ruperi — forma liniară a DNA. Molecula liniară rezultată a fost recircularizată cu ajutorul polinucleotidligazei, iar *CCI* astfel obținut a fost metilat. Supus acțiunii Eco *R*I, DNA metilat nu a mai putut fi scindat de către enzima de restricție dovedindu-se că — odată ce molecula a fost modificată prin metilare — activitatea de restricție nu mai poate avea loc, deoarece metilarea s-a produs tocmai în secvența polinucleotidică de recunoaștere.

În prima etapă, DNA-SV40 *CCI* a fost hidrolizat sub acțiunea endonucleazei de restricție Eco *R*I la forma liniară. Grupările 5'-fosfat terminale ale celor două catene ale formei liniare au fost înlocuite cu 5'-^{32}P-fosfat, în prezența polinucleotidkinazei și a fosfatazei alcaline. În acest fel s-a marcat situsul de acțiune a endonucleazei de restricție Eco *R*I.

Moleculele de DNA astfel marcate au fost mai întîi încălzite pentru „topirea" duplexului de DNA (adică pentru desfacerea legăturilor de hidrogen dintre cele două catene), iar apoi preparatul a fost răcit brusc, pentru a provoca o renaturare parţială. În etapa următoare, concatemerii rezultaţi au fost recircularizaţi cu ajutorul polinucleotidligazei. În timp ce forma liniară a DNA SV40 nu constituie substrat pentru enzima de restricţie Eco *RI*, forma *CCI* — refăcută în urma tratamentului cu ligază — redevine susceptibilă la scindarea restrictivă.

În continuare s-a procedat la metilarea specifică a DNA *CCI* cu enzima de modificare corespunzătoare, folosind ^{3}H-metil-SAM ca donor de grupări metil. Rezultatul a fost obţinerea unui DNA *CCI* metilat, care s-a dovedit a fi rezistent la acţiunea endonucleazei de restricţie corespunzătoare şi care a putut fi hidrolizat numai prin mijloace chimice.

Ultima etapă a experimentului a constat în determinarea poziţiei grupărilor metil marcate, introduse în molecula de DNA. Analiza a stabilit că produsele metilării constau din N_6- metiladenină, sub forma unui dinucleotid dublu marcat şi anume ^{32}P-pAp-^{3}H-6mA, care se află în secvenţa nucleotidică a centrului de recunoaştere al endonucleazei de restricţie Eco *RI*.

În acest mod s-a demonstrat că ambele enzime ale sistemului *R—M* Eco I — endonucleaza de restricţie şi metilaza de modificare —

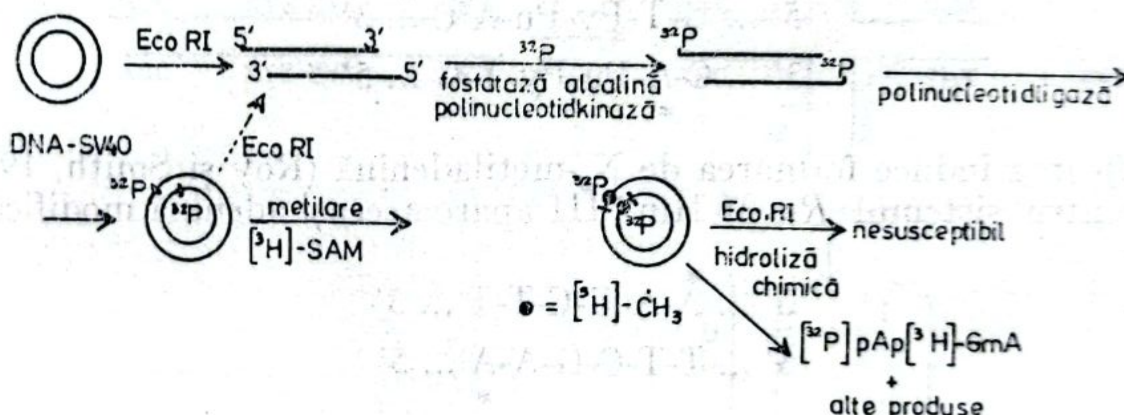
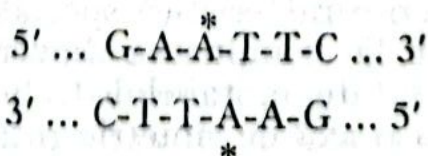


Fig. 12. Demonstrarea identităţii secvenţei nucleotidice de recunoaştere, clivare şi modificare pentru situsul *R—M* de tip II (după *Dugaiczyk* şi colab., 1974).

acţionează asupra aceleiaşi secvenţe nucleotidice. În DNA complet modificat, fiecare catenă este purtătoarea cîte unei adenine metilate (Å):



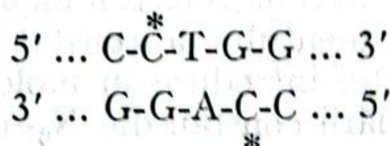
5' ... G-A-A*-T-T-C ... 3'

3' ... C-T-T-A-A*-G ... 5'

Schematic, experimentul poate fi redat ca în fig. 12.

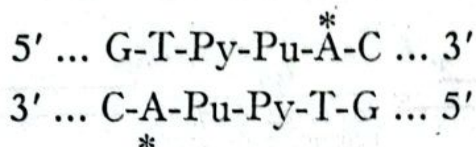
Alte experimente au arătat că ruperea duplexului polideoxiribonucleotidic și metilarea lui pot avea loc chiar cu fragmente relativ scurte (cca 400 perechi baze), dacă este prezentă secvența de recunoaștere caracteristică sistemului enzimatic respectiv. Pentru sistemul *R—M* Eco I, această specificitate de substrat a fost demonstrată lucrîndu-se chiar pe un octamer artificial, autocomplementar, de tipul pT-G-A-A-T-T-C-A. Și în acest caz ruperea s-a produs între G și A, iar metilarea a condus la formarea de N_6-metiladenină în poziția mediană a secvenței de recunoaștere.

Folosind aceeași tehnică de lucru, Boyer și colab. (1973) și Bigger și colab. (1973) au demonstrat că în cazul sistemului *R—M* Eco II, cu secvența de recunoaștere pentanucleotidică:

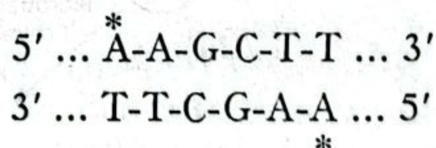


se modifică citozina adiacentă poziției mediane a secvenței de recunoaștere, cu formare de 5-metilcitozină (C*).

Precizăm, de asemenea, că în sistemul *R—M* Hin*d* II, care are specificitatea de acțiune asupra secvenței:



modificarea induce formarea de N_6-metiladenină (Roy și Smith, 1973), iar pentru sistemul *R—M* Hin*d* III apare aceeași adenină modificată:



În plus, metilaza Eco I acționează asupra DNA λ introducînd 10 M de grupări $—CH_3$ per mol de genom, ceea ce corespunde numărului situsurilor de rupere pentru Eco *R*I și aduce un nou argument asupra identității dintre situsul de recunoaștere, modificare și rupere.

III. 3.1.4. Mecanismul de acțiune al enzimelor de restricție de tip II.

A. *Palindromul.* Situsul de recunoaștere al enzimelor din sistemele *R—M* de tip II are o caracteristică specială, care constă în simetria lui, după cum reiese la examinarea secvențelor tetranucleotidice și hexanucleotidice prezentate în tabelul 1. Se constată că în toate cazurile se poate imagina o axă de simetrie rotațională dublă, perpendiculară pe axa helixului, ceea ce arată că, atunci cînd secvențele de bază din cele două catene se citesc cu respectarea polarității 3′ → 5′,

ele vor fi identice. În acest caz, se spune că este vorba de *secvența palindrom*.

Întrucît lanțurile individuale ale zonelor palindromice din duplexul de DNA sînt autocomplementare, ele pot fi relativ ușor detectate și izolate. Folosindu-se diverse tehnici de separare s-a demonstrat că DNA din celulele eucariote, spre deosebire de cel al celulelor procariote, este caracterizat de existența a numeroase zone palindromice. Într-un genom pot exista mii de zone palindromice, deci cîteva procente din structură. Lungimea zonelor palindromice este variabilă, dar poate ajunge la sute sau chiar mii de perechi de baze. Zonele care conțin palindroame pot fi foarte apropiate unele de celelalte sau pot fi despărțite de sute sau de mii de alte perechi de baze.

Prin plierea catenelor polinucleotidice care conțin palindroame se pot forma zone duplex intracatenare, cu așezarea bazelor față în față, în ordine reciprocă inversă. Apar așa-numitele forme „cruciforme". Dacă intervine o denaturare a duplexului, aceste forme cruciforme vor da naștere unor regiuni „în ac de păr", denumite *fold-back* sau *snap-back* (fig. 13) (Engberg și Klenow, 1977).

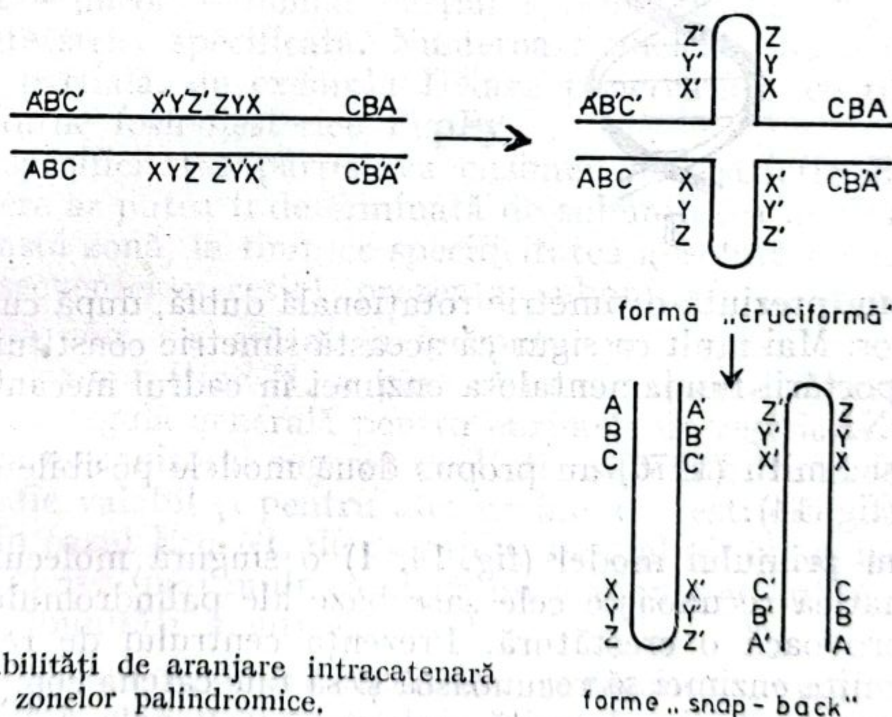


Fig. 13. Posibilități de aranjare intracatenară a zonelor palindromice.

În majoritatea cazurilor, funcția acestor zone palindromice este necunoscută, dar în ultimii ani s-a stabilit, ca o caracteristică a enzimelor de restricție și de modificare de tip II, necesitatea existenței în duplexul de DNA a unor baze perechi, așezate în ordine reciprocă inversă, pentru ca enzimele să-și poată îndeplini funcțiile.

B. *Mecanismul de acțiune al enzimelor de restricție de tip II (cazul Hind II)*. Enzima Hind II are, după cum s-a arătat în tabelul 1, un

centru de recunoaştere care conţine următoarea secvenţă hexanucleotidică:

5' ... GpTpPy ↓ pPupApC ... 3'

3' ... CpApPup ↑ PypTpG ... 5'

Trecînd — pentru moment — peste ambiguitatea zonei centrale a secvenţei de recunoaştere, se constată că secvenţa de mai sus, care este

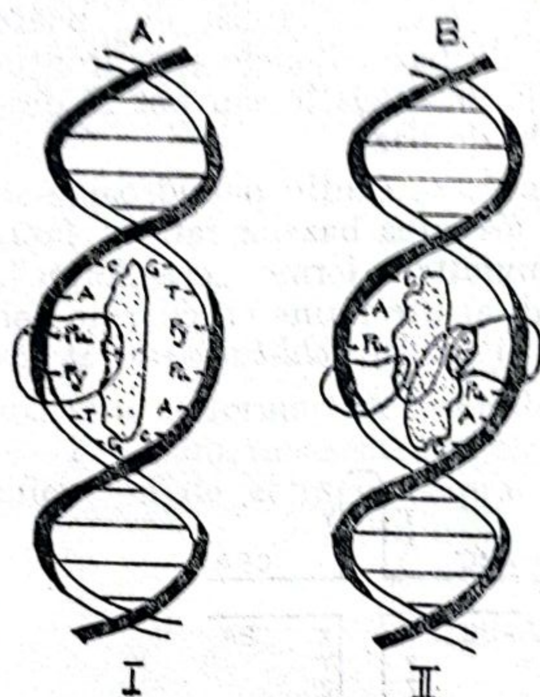


Fig. 14. Recunoaşterea secvenţei nucleotidice simetrice de către endonucleaza restrictivă Hind II (după *Kelly* şi *Smith*, 1970).

un palindrom, prezintă o simetrie rotaţională dublă, după cum s-a precizat anterior. Mai mult ca sigur că această simetrie constituie o reflectare a comportării fundamentale a enzimei în cadrul mecanismului de clivare a DNA.

Kelly şi Smith (1970) au propus două modele posibile de acţiune a enzimei (fig. 14).

Conform primului model (fig. 14, I) o singură moleculă de proteină enzimatică recunoaşte cele şase baze ale palindromului de pe o catenă şi provoacă o crestătură. Prezenţa centrului de recunoaştere simetric permite enzimei să recunoască şi să taie catena complementară în exact aceeaşi poziţie, datorită simetriei rotaţionale duble, obţinîndu-se astfel clivarea duplexului. Dacă secvenţa de recunoaştere ar fi fost asimetrică şi ambele procese — de recunoaştere şi de clivare — ar fi implicat doar una dintre catene, ar fi fost necesare două enzime, cu două situsuri de recunoaştere specifice şi diferite.

O posibilitate şi mai interesantă este oferită de cel de al doilea model (fig. 14, II), care sugerează că simetria centrului de recunoaştere ar reflecta inclusiv o simetrie intrinsecă a enzimei (Kelly şi Smith, 1970; Boyer, 1971). Este posibil ca proteinele enzimatice, formate din sub-

unități identice sau aproape identice, să prezinte o axă rotațională dublă. Aceste considerații sugerează posibilitatea ca recunoașterea situsului să se facă concomitent pe ambele catene ale duplexului, fiecare subunitate enzimatică recunoscînd o aceeași secvență de trei baze. Din punct de vedere al economiei de informație genetică este mai „ieftin" să se producă două subunități capabile să recunoască aceeași secvență scurtă dintr-o secvență mai lungă în ambele catene, decît să se „fabrice" o proteină mult mai mare, care să recunoască întreaga secvență.

În acest model, fiecare din cele două subunități enzimatice identice este constituită din alte două subunități diferite, una de „recunoaștere" și una de „clivare" (de rupere). Această „diviziune a muncii" ar putea avea loc din două motive. În primul rînd, există dovezi genetice că în procesele de restricție și de modificare, din sistemul *E. coli*, sînt incluse produsele a cel puțin trei gene: unul din produse îndeplinește funcția de restricție, un altul pe cea de modificare, iar al treilea produs are rolul de a determina specificitatea de situs (Arber și Linn, 1969). În al doilea rînd, secvența de recunoaștere a endonucleazei de restricție are două nivele diferite de specificitate: perechile de baze din zona centrală sînt — uneori — numai parțial specificate, în timp ce restul secvenței este strict specificată. Numeroase nucleaze au acest tip de specificitate parțială, de exemplu DNaza pancreatică, ce rupe preferențial legăturile fosfodiesterice PupPy.

Astfel, specificitatea parțială a enzimei de restricție Hin*d* II în zona de rupere ar putea fi determinată de subunitatea nucleazică ce se leagă în această zonă, în timp ce specificitatea absolută a enzimei pentru restul secvenței necesită prezența subunității de recunoaștere.

Așa după cum s-a arătat la începutul prezentării mecanismului de acțiune a enzimei Hin*d* II, se pare că recunoașterea simetrică a secvențelor este o regulă generală pentru enzimele de restricție de tip II. S-ar putea ca mecanismul sugerat de Kelly și Smith, în special cel de al doilea, să fie valabil și pentru alte enzime de restricție, cu atît mai mult cu cît în cazul Eco *R*I, de exemplu, s-a stabilit că molecula enzimei este un dimer (mai mult ca sigur un homodimer, adică un dimer format din subunități identice).

Se poate afirma că, dintre enzimele care recunosc anumite secvențe specifice în DNA, endonucleazele de restricție par a fi cele mai discriminatorii. Cum poate fi atinsă o atît de strictă specificitate?

În general, aceasta se realizează pe baza unor modificări structurale ale duplexului de DNA, întrucît din studiile experimentale întreprinse s-a stabilit că, în DNA cu configurație dublu helicoidală, enzimele recunosc cu mare greutate anumite secvențe nucleotidice specifice. Crick a arătat că, de obicei, centrii activi ai enzimelor sînt localizați în unele „cavități" existente în structura lor. Fără a valida universalitatea acestei presupuneri, Meselson și colab. (1972) au sugerat că este de așteptat

ca secvențele nucleotidice de recunoaștere pentru endonucleazele de restricție să se preteze la un anumit aranjament spațial, care să permită funcționarea sistemului „cheie-broască" (enzimă-substrat).

Modelul propus de Meselson și colab. (fig. 15) constituie o posibilă rezolvare a problemei: în zona situsului de recunoaștere duplexul se

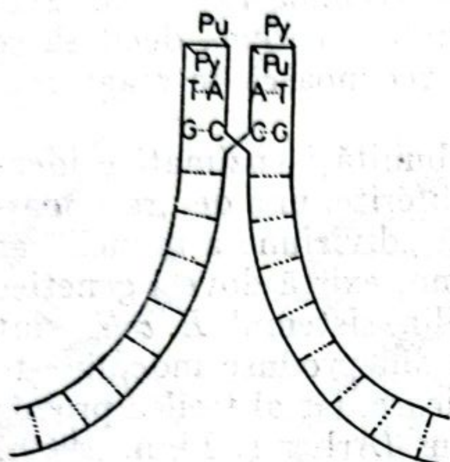


Fig. 15. Rearanjarea moleculară a secvențelor nucleotidice cu simetrie rotațională dublă din situsuri de recunoaștere pentru Hin*d* II (după *Meselson* și colab., 1972).

desface, iar perechile de baze se refac în cadrul aceleiași catene, cu apariția structurilor numite *fold-back* sau *snap-back*. În acest mod se creează o cavitate, precum și două zone („bucle") în care se află bazele centrale ale secvenței de recunoaștere, nelegate prin punți de hidrogen. De aici s-ar mai putea presupune și faptul că bazele Pu și Py nu sînt, în mod obligatoriu, complementare.

Acest tip de structură are o comportare specială, care ar putea — eventual — să contribuie la explicarea mecanismului procesului de restricție și anume:

— posibilitatea de formare a „buclelor" este limitată de anumite secvențe nucleotidice și anume numai la cele care prezintă o simetrie rotațională dublă; apar structuri noi, total diferite de dublul helix clasic al DNA, ceea ce face ca o parte din dificultățile de recunoaștere specifică de către enzima de restricție a secvenței specifice să fie depășite;

— noul aranjament al bazelor în cadrul situsului de recunoaștere face ca interacțiunea DNA cu enzimele să fie mult facilitată față de structura duplex;

— datorită existenței „buclelor", centrul de recunoaștere poate fi înglobat în cavitatea care adăpostește centrul activ al enzimei de restricție.

De asemenea, s-ar putea ca tocmai această structură specială pe care o poate dobîndi DNA în zona palindromului de recunoaștere pentru endonucleazele de restricție, să-l facă accesibil și enzimelor de modificare corespunzătoare dintr-un anumit sistem *R—M*.

În cazul enzimei de restricție Eco *R*I, folosindu-se drept substrat un octanucleotid sintetic autocomplementar, care conține secvența de recunoaștere pentru sistemul *R—M* Eco *R*I, s-a constatat că tempera-

tura optimă de lucru pentru ambele enzime din sistem (endonucleaza și metilaza) coincide cu temperatura de topire (T_m) a structurii duplex respective, ceea ce ar veni în sprijinul teoriei *snap-back* („ac de păr").

Există însă și păreri contrare; de exemplu, în cazul sistemului *R—M* Eco I, Boyer și colab. (1971) au constatat că ambele enzime pot acționa foarte bine și asupra duplexului nemodificat prin formarea structurilor în „ac de păr".

III.3.1.5. **Proprietățile unor enzime de restricție și modificare de tip II.** Dintre numeroasele enzime de restricție și de modificare izolate și caracterizate pînă în prezent, au fost alese doar cîteva exemple, pentru a prezenta diversitatea proprietăților lor.

Proprietățile sistemului Eco I. Endonucleaza și enzima de modificare Eco I au fost izolate din *E. coli*. Sistemul *R—M* Eco I este controlat genetic de către DNA plasmidic bacterian, după cum au arătat Watanabe și Noshida (1953) și Yoshimori și colab. (1972): inițial, genele pentru acest sistem au fost asociate cu un factor plasmidic fi^+R, dar ulterior s-a constatat că, de fapt, sînt controlate de o plasmidă mică (masa moleculară 7×10^6 daltoni) (Betlach și colab., citați de Boyer și colab. 1974).

În sistemul *R—M* Eco I există două enzime cu entități diferite, și anume o enzimă de restricție și o enzimă de modificare. Ele au putut fi izolate și purificate pînă la un înalt grad de omogenitate, ceea ce a permis chiar determinarea compoziției lor în aminoacizi (tabelul 5).

Tabelul 5

Compoziția în aminoacizi a endonucleazei restrictive și a metilazei din sistemul Eco I (după Boyer și colab., 1974)

Aminoacidul	Moli		Resturi aminoacid/subunitate	
	metilază	endonuclează	metilază	endonuclează
Cys+Cys-S-S-Cys	2,00	0,66	6,13	1,70
Asp	18,80	14,50	57,50	37,30
Thr	2,58	3,58	7,89	9,23
Ser	7,20	6,84	22,00	17,70
Glu	7,91	10,50	24,10	27,20
Pro	3,10	2,85	9,50	7,37
Gly	5,47	6,10	16,70	15,70
Ala	3,03	5,66	9,20	14,60
Val	5,09	5,61	15,60	14,50
Met	0,28	1,70	0,84	4,30
Ileu	6,01	7,92	18,40	20,40
Leu	8,00	10,20	24,50	26,30
Tyr	5,52	2,72	16,90	7,09
Phe	9,15	5,87	27,90	15,10
Lys	9,34	7,63	28,60	19,70
His	2,03	2,03	6,23	5,25
Arg	3,68	4,66	11,28	12,10

Compararea compoziţiei celor două enzime din sistem arată existenţa unei mari asemănări, ceea ce sugerează că ele au provenit de la o genă comună, care probabil a suferit un proces de divergenţă în cursul evoluţiei (Boyer şi colab. 1974).

Preparatele de endonuclează de restricţie Eco I, analizate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă cu DDS sau prin ultracentrifugare, s-au dovedit a fi omogene: masa moleculară a formei denaturate şi reduse a fost de 28500 daltoni. În absenţa agenţilor de reducere şi de denaturare s-au identificat dimeri şi tetrameri, activi enzimatic, cu masele moleculare de 57000 şi, respectiv 114000 (Modrich şi Zabel, 1976). Metilaza de modificare Eco I constă însă dintr-un monomer, cu o masă moleculară de 40000—55000 daltoni (Roulland-Dussoix şi colab., 1974; Greene şi colab., 1974).

Activitatea endonucleazei de restricţie Eco I se desfăşoară în condiţii optime la *p*H 7,5, în tampon Tris 0,1 M, în prezenţa ionilor de Mg^{2+} la o concentraţie de 0,01 M, la 37°C.

Totodată, s-a constatat că, în timp ce între concentraţia de Eco *R*I şi viteza reacţiei endonucleolitice pe care o catalizează există o relaţie liniară (fig. 16), pentru metilaza corespunzătoare relaţia este neliniară,

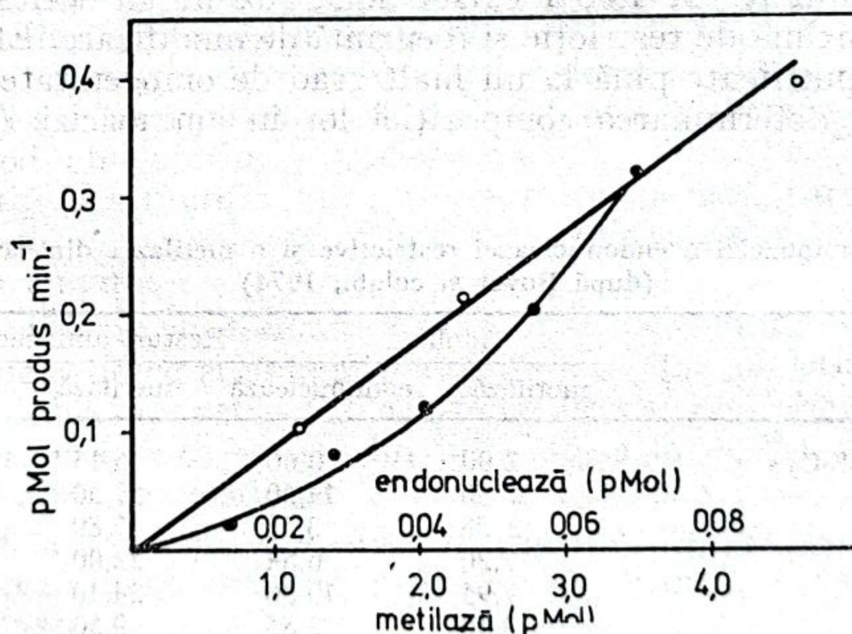


Fig. 16. Variaţia vitezei reacţiilor de metilare (●) şi de fragmentare endonucleolitică (o), pentru sistemul *R*—*M* Eco *R*I în funcţie de concentraţia enzimei (după Boyer şi colab., 1974).

ceea ce a sugerat existenţa unor interacţiuni cooperative între moleculele de metilază, cu apariţia unor oligomeri.

Metilaza Eco I acţionează asupra DNA din bacteriofagul λ şi din virusul SV40, introducînd cîte 10 şi, respectiv 20 M de grupări metil per mol de genom, ceea ce corespunde cu numărul situsurilor de rupere

pentru enzima de restricție Eco *R*I față de substraturile citate (Boyer și colab., 1974) și aduce un nou argument în favoarea identității secvenței nucleotidice a situsului de recunoaștere, de metilare și de clivare.

Proprietățile sistemului Eco II. Genele pentru enzimele Eco II se găsesc pe o plasmidă $fi^{-}R$, denumită *R*15, care codifică rezistența față de o serie de antibiotice. Endonucleaza de restricție nativă are o masă moleculară de aproximativ 86000, cu subunități în jur de 40000 daltoni, iar metilaza are o masă moleculară de 55000 daltoni (Roulland-Dussoix și colab., 1974). Metilaza Eco II produce metilarea a 32 resturi de citozină în DNA λ și SV40, ceea ce este în bună concordanță cu numărul de legături fosfodiesterice hidrolizate de către endonucleaza Eco *R*II (Bigger și colab., 1973; Subramanian și colab., 1974).

Proprietățile endonucleazei Bam HI. Smith și Chirikjan (1979) au purificat din *Bacillus amyloliquefaciens* (RUB 500) o endonuclează de restricție. La electroforeză pe gel de poliacrilamidă, în prezența DDS, enzima disociază în subunități cu masa moleculară de 22000 ± 500. *p*H-ul optim al enzimei se află într-o zonă foarte îngustă, în jurul lui 8,5. Pentru desfășurarea activității sale, enzima Bam necesită prezența ionilor Mg^{2+}, care pot fi parțial înlocuiți prin ioni Mn^{2+}. Enzima este stabilă cel puțin un an, în tampon Tris 20 mM—HCl *p*H 7,5 cu EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 2 mM și 10% glicerol. Endonucleaza nativă se găsește ca dimer cu masa moleculară de 46000 ± 500, iar în absența sărurilor se poate izola și un tetramer cu masa moleculară de 90000 ± 500. Această proprietate este comună cu alte două endonucleaze de restricție, Eco *R*I și Bst I. În tampoane cu NaCl 0,1 M enzima rămîne stabilă pînă la 70°C. Bam *H*I este o enzimă de restricție pentru care nu s-a descoperit, încă, o metilază de modificare corespunzătoare.

Proprietățile sistemului Bsp. Koncz și colab. (1978) au purificat împreună o endonuclează de restricție și o metilază din *Bacillus sphericus.* Analiza prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă cu DDS a arătat că endonucleaza este un polipeptid cu masa moleculară de 35000, iar activitatea optimă o are la *p*H în jurul valorii 8,2. Activitatea enzimei se manifestă în prezența ionilor Mg^{2+} la o concentrație optimă de 20 mM. Prezența ionilor Zn^{2+} inhibă reacția. Randamentul de obținere a enzimei de restricție Bsp este superior oricărei alte endonucleaze de restricție cunoscute pînă în prezent. S-a constatat că această enzimă este capabilă să hidrolizeze și legăturile fosfodiesterice din DNA monocatenar, dar cu o viteză mult mai mică decît în cazul DNA bicatenar. Referitor la metilaza corespunzătoare, autorii precizează că ea transferă grupările $—CH_3$ de la SAM la citozina din secvența:

5′ ... G-G-C-C ...

... C-C-G-G ... 3′

III.3.2. Sisteme *R-M* de tip I

Se cunosc şi sisteme *R—M* care conţin enzime mult mai complexe şi care — pentru a-şi putea exercita acţiunea — cer prezenţa unei serii de cofactori. Centrul nucleotidic de recunoaştere este acelaşi, atît pentru fenomenul de restricţie, cît şi pentru cel de modificare, dar în timp ce modificarea DNA prin metilare are loc în zona centrului de recunoaştere, clivarea duplexului de DNA — după cum se va arăta ulterior — se face în afara acestei secvenţe (Horiuchi şi Zinder, 1972; Vovis şi colab., 1973; Linn şi colab., 1974; Hartman şi Zinder, 1974).

Cele mai cunoscute şi mai studiate sisteme *R—M* de tip I sînt Eco *K* şi Eco *B*, izolate ambele din *E. coli* tulpina *K*12 şi respectiv *B*. Împreună cu alte sisteme *R—M* din alte tulpini de *E. coli* şi din *Salmonella typhimurium*, Eco *K* şi Eco *B* formează o familie de enzime înrudite genetic şi funcţional; genele pentru diverse sisteme sînt alele şi se pot înlocui reciproc, în cazul unor deficienţe mutaţionale. Pe baza unor date genetice s-a acceptat în general, dar încă nu s-a arătat în mod concret, că responsabil de recunoaşterea substratului de DNA este produsul unei singure gene. Este de aşteptat ca acest produs să fie prezent atît în endonucleaza de restricţie, cît şi în metilaza de modificare.

Enzimele de restricţie şi metilazele de modificare ale sistemului *R—M* Eco *K* şi Eco *B* au fost obţinute cu un grad înalt de puritate şi s-a constatat că *in vitro* acţionează numai asupra DNA nemodificat. Analiza compoziţiei subunităţilor acestei enzime a arătat că se pot forma oligomeri din trei polipeptide diferite, denumite α, β, γ, cu mase moleculare de 135000, 60000 şi 55000. Pentru exprimarea activităţii de restricţie este necesară prezenţa a cel puţin a cîte unei subunităţi din fiecare tip; de exemplu, pentru enzima de restricţie Eco *K* ar corespunde, din acest punct de vedere, o formulă $\alpha_2\beta_2\gamma$, cu o masă moleculară de 450000 daltoni. Acelaşi complex enzimatic poate prezenta şi o activitate de modificare prin metilare. Modificarea se poate obţine şi cu o enzimă cu masă moleculară mai mică, formată exclusiv din subunităţi β şi γ, ceea ce înseamnă că una dintre aceste subunităţi este neapărat implicată în acţiunea de recunoaştere a situsului de pe duplexul de DNA, precum şi în fenomenul de modificare, în timp ce subunitatea α este direct legată de reacţia de restricţie.

Totuşi, între enzimele de restricţie şi de modificare de tip I există unele relaţii care intrigă şi care nu au fost complet înţelese. După cum s-a arătat mai sus, preparatele de endonuclează de restricţie *K*, de înaltă puritate, au şi o activitate de metilază *K* specifică. Metilaza *K* de modificare nu are însă activitate de restricţie. În sistemul Eco *B* s-au găsit două metilaze de modificare: una dintre ele nu prezintă acţiune de hidroliză asupra fosfodiesterilor, în timp ce cealaltă pare a fi şi o endonuclează de restricţie tipică. De aici s-a tras concluzia că în cadrul sistemelor *R—M* de tip I ambele activităţi sînt exercitate de către aceeaşi

proteină care, la un moment dat, ar putea să disocieze, formînd enzima de modificare, ce nu mai are acțiune de restricție.

Susceptibilitatea unei molecule de DNA la restricție și modificare depinde de prezența unui situs de recunoaștere nemodificat, ceea ce înseamnă că nucleotidele care suferă metilarea în cursul reacției de modificare fac parte din situsul de recunoaștere. Prin mutație, un astfel de situs de recunoaștere poate fi pierdut sau cîștigat. Numărul și poziția situsurilor de recunoaștere sînt determinate genetic.

Pe baza frecvenței acestor situsuri și considerînd că ele apar la întîmplare pe duplexul DNA este de așteptat ca secvențele de recunoaștere pentru Eco *K* și Eco *B* să conțină 6—8 perechi de nucleotide, așezate în secvență continuă sau discontinuă, după cum au presupus Arber și Linn (1969).

În concordanță cu cele de mai sus, s-a arătat că DNA din mutanții fagici, izolați pe baza lipsei lor de sensibilitate la enzima de restricție Eco *B*, nu au constituit substrat nici pentru enzima de modificare din sistemul respectiv. De asemenea, s-a stabilit că la tulpina sălbatică a bacteriofagilor respectivi centrul de recunoaștere poate fi modificat prin metilarea adeninei pe care o conține. Pînă în prezent, încercările de determinare a secvenței de nucleotide în jurul N_6-metiladeninei (adenină N_6-modificată) nu au dus la nici un rezultat. Deocamdată nu se cunoaște compoziția nucleotidică a situsului de recunoaștere la Eco *K*.

Folosind ca substrat molecule de DNA cu un singur situs de recunoaștere pentru Eco *B*, clivarea sub acțiunea enzimei de restricție se petrece în mai multe puncte. De aici concluzia că situsurile de rupere sînt diferite de cele de recunoaștere, dar nu se știe ce element anume determină situsurile de rupere.

Foarte recent s-a reușit stabilirea secvenței nucleotidice din centrul de recunoaștere pentru una din endonucleazele de tip I și anume pentru Eco *B* (Ravetch și colab., 1978). Centrul de recunoaștere al acestei enzime constă dintr-o secvență de 15 nucleotide, care include la un capăt trimerul nucleotidic 5′-T-G-A-3′, urmat de un domeniu de opt nucleotide variabile, după care, la celălalt capăt, se află tetramerul 5′-T-G-C-T-3′. Secvența determinată nu prezintă, ca în cazul endonucleazelor de restricție de tip II, o simetrie rotațională dublă. Înlocuirea unei singure baze din domeniile cu secvență nucleotidică constantă (zona trimerului sau cea a tetramerului) duce la pierderea selectivității pentru ambele activități, de restricție și de modificare. După cum s-a determinat, modificarea are loc la două resturi de adenină, unul din trimerul 5′-T-G-A-3′ și celălalt din catena complementară tetramerului 5′-T-G-C-T-3′ și anume la primul reziduu, corespunzător 5′-T.

Întrucît cele două domenii nucleotidice de compoziție constantă sînt separate de opt baze și deoarece structura de dublă elice a DNA are o periodicitate de 10 perechi de baze (Watson și Crick, 1953), rezultă

că trimerul și tetramerul de compoziție constantă se află de aceeași parte a duplexului de DNA. Mai mult chiar, cele două grupări metil — introduse prin modificare în pozițiile prezentate mai sus — se află de asemenea de aceeași parte a duplexului, în scobitura cea mare, cu un unghi de $\approx 70°$ între ele. De aici concluzia că enzima Eco *RB* interacționează cu o singură catenă a duplexului.

III.3.2.1. Etapele procesului de restricție cu endonucleaze de tip I și rolul cofactorilor. Pentru a funcționa, sistemele *R—M* de tip I reclamă prezența a numeroși factori: S-adenozil-*L*-metionină (AdoMet sau SAM), ATP și Mg^{2+} pentru activitatea de restricție (Meselson și Yuan, 1968; Linn și Arber, 1968). Modificarea poate avea loc și în prezența doar a SAM, deși s-a constatat că prezența ATP și Mg^{2+} o stimulează. Pentru explicarea mecanismului prin care acționează sistemele *R-M* de tip I cu participarea efectorilor enunțați, Boyer (1971) a propus modelul reprezentat în fig. 17.

Studiile întreprinse pînă în prezent asupra rolului cofactorilor au arătat că ambele procese — de restricție și de modificare — pot fi obținute cu aceeași enzimă nativă, într-o succesiune de reacții. Unii dintre intermediarii care apar în cursul acestor procese au putut fi izolați și studiați. De exemplu, complecșii enzimă-substrat (enzimă de restricție-DNA) pot fi stabilizați prin adăugare de EDTA.

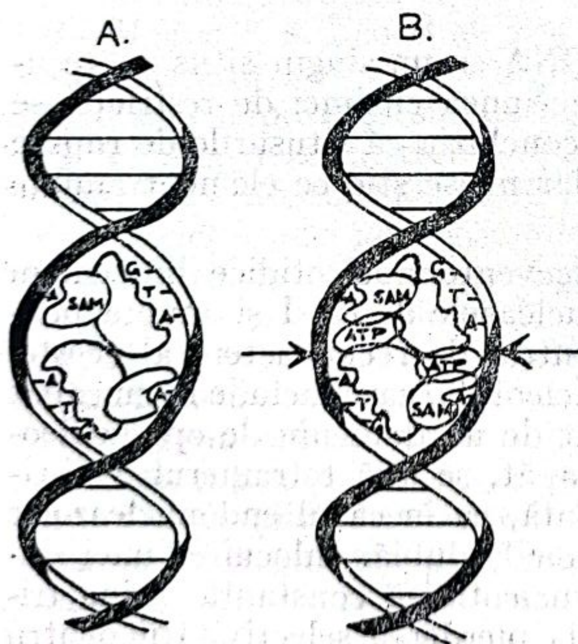


Fig. 17. Modele posibile pentru acțiunea restrictazei (A) și a metilazei (B) de tip I (după *Boyer*, 1971).

Arber și colab. (1974) au propus următoarea secvență de evenimente care poate duce fie la restricție, fie la modificare (fig. 18).

A. *Legarea SAM la enzimă.* Enzima Eco *K* nativă, nu și cea care a fost inactivată prin căldură, leagă SAM. Reacția nu necesită prezența Mg^{2+} și a ATP. Complexul SAM-enzimă, purificat pe coloană de Sephadex G-50, s-a incubat cu un amestec de reacție în vederea procesului de

restricție, fără a se mai adăuga alți cofactori, în afară de SAM deja existent. Se produce ruperea, clivarea duplexului de DNA. De aici concluzia că legarea SAM la enzimă trebuie să fie specifică, iar complexul rezultat

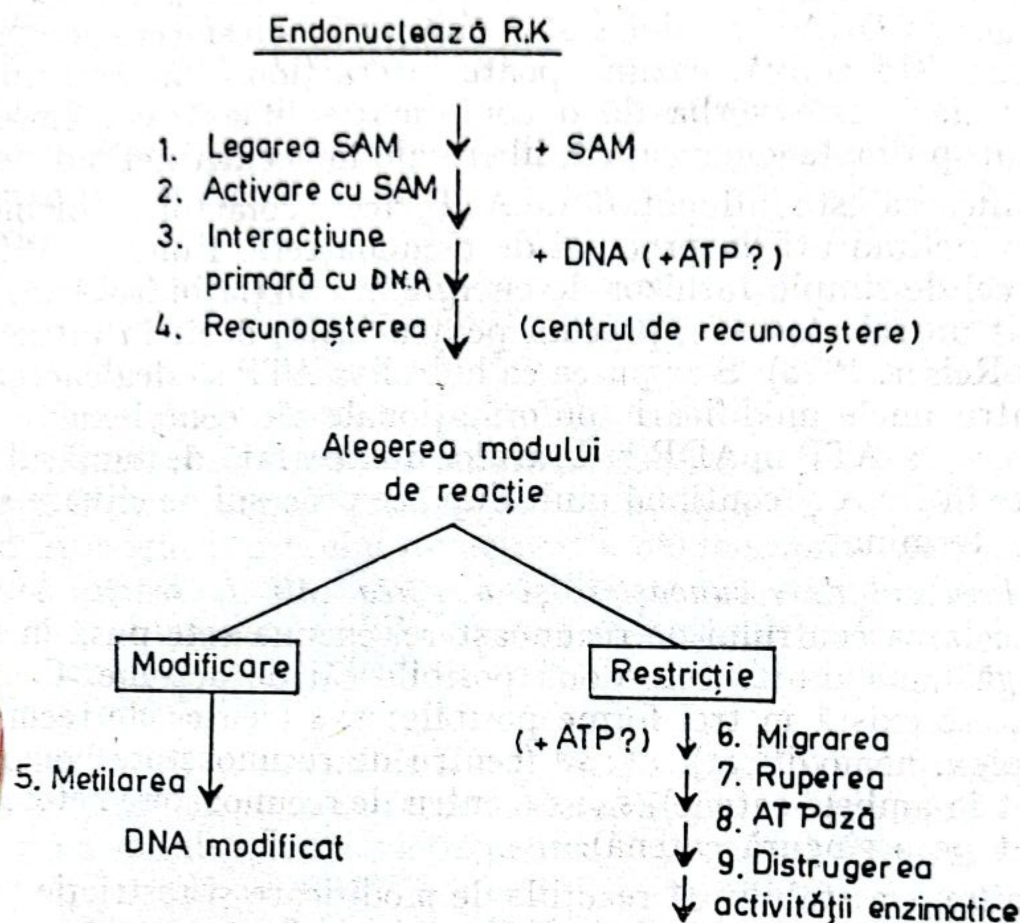


Fig. 18. Succesiunea reacțiilor în cursul procesului de restricție-modificare în sistemele *R—M* de tip I (după *Arber* și colab., 1974).

nu mai necesită o cantitate suplimentară de SAM. Tot de aici, se poate presupune că SAM ar putea juca rol de efector alosteric, după cum au demonstrat recent Yuan și Reiser (1978).

B. *Activarea enzimei cu SAM*. Procesul de activare a enzimei se pare că se datorește unor modificări conformaționale ale enzimei. S-a constatat că forma activată a enzimei este instabilă și că se distruge rapid în absența duplexului de DNA ca substrat. Noile specii, inactive, se pot reactiva în prezența unor concentrații mari de SAM. Încă nu s-a stabilit cu precizie dacă SAM este consumat numai ca donor de grupări metil de către endonucleazele Eco *B*, Eco *K* etc. sau constituie și un furnizor de energie, alături de rolul său de efector alosteric sau dacă îndeplinește toate aceste funcții. S-a presupus că această dependență de SAM a unor sisteme *R-M* ar putea să reprezinte un mecanism de control al celulei contra „sinuciderii".

C. *Interacțiunea primară cu DNA*. Enzima activată poate să interacționeze cu orice DNA, încercînd să găsească centrul de recunoaștere. Fără îndoială, distrugerea formei activate poate fi preîntîmpinată prin

adăugarea de DNA modificat sau a unui DNA mutant, fără centru de recunoaştere. Această protejare faţă de inactivare nu necesită prezenţa ATP. Enzima protejată se poate testa prin adăugarea de DNA nemodificat şi ATP. Aceste fapte sugerează că enzima activată intră rapid în interacţiune cu DNA şi rămîne stabilizată pînă la desfacerea de pe DNA. Cîtă vreme este activă, enzima poate interacţiona din nou cu DNA, indiferent dacă este vorba de o conformaţie liniară sau circulară a duplexului, prezenţa unor capete libere ale moleculei nefiind necesară.

Modificarea este influenţată de ATP, acest cofactor facilitînd metilarea, dar nefiind util în procesul de recunoaştere. Rolul ATP îl depăşeşte pe cel de simplu furnizor de energie în reacţia hidrolitică, dar nu i s-a găsit un rol alosteric, precum pentru SAM, decît în ultimul timp (Yuan şi Reiser, 1978). S-ar putea ca hidroliza ATP să dea energia necesară pentru unele modificări conformaţionale ale complexului enzimă-DNA. Trecerea ATP în ADP şi P_i are loc în exces faţă de numărul de legături rupte în DNA şi continuă mult după ce procesul de clivare a duplexului s-a terminat.

D. *Procesul de recunoaştere şi alegerea căii de reacţie a enzimei*. După decelarea centrului de recunoaştere, enzima este pusă în situaţia să „aleagă" una dintre cele două posibile căi de acţiune. Centrul de recunoaştere există în trei forme posibile: $s:s$ (centru de recunoaştere homoduplex, nemodificat), $s^m:s^m$ (centru de recunoaştere homoduplex, modificat în ambele catene), $s_m:s$ (centru de recunoaştere heteroduplex, modificat pe o singură catenă).

In vitro, s-a stabilit că reacţiile de modificare şi restricţie pot avea loc numai cu homoduplexul de DNA nemodificat, $s:s$. S-a găsit că restricţia este un proces rapid, iar modificarea este mult mai lentă, mai ales în absenţa Mg^{2+} şi a ATP, pentru a preîntîmpina clivarea, care depinde cu totul de aceşti cofactori. Deci, endonucleaza de restricţie nu acţionează nici pe $s^m:s^m$, nici pe $s^m:s$, dar duplexul de tip $s^m:s$ este un foarte bun substrat pentru modificarea *in vitro* şi pentru studierea rolului cofactorilor asupra acestui proces: modificare lentă în absenţa ATP (30 minute) şi mult mai rapidă (1 minut) în prezenţa ATP. Experimentele de modificare pe homoduplex $s:s$ durează cca 9 ore, în absenţa ATP. În acest fel s-a arătat că alegerea de către enzimă a căii de reacţie (spre modificare sau spre restricţie) depinde numai de natura duplexului din zona de recunoaştere şi nu de prezenţa sau de absenţa ATP, cum se crezuse iniţial.

În celulele bacteriene în creştere, heteroduplexul $s^m:s$ este un substrat natural pentru modificare. Metilarea *in vivo* a centrului de recunoaştere are loc rapid, după apariţia noilor catene de DNA în cursul multiplicării. Centrii $s:s$ duc la restricţie, iar $s^m:s$ duc la modificare. Experimentele cu tulpini de bacteriofag λ avînd un singur centru de recunoaştere pentru sistemul *R-M* Eco *K*, au sugerat că probabilitatea

de modificare a acestui unic centru este de cca 30 de ori mai mică decît probabilitatea de a suferi procesul de restricție. Pentru moleculele de DNA avînd mai mult decît un centru de recunoaștere nemodificat, integritatea biologică se păstrează numai dacă toți centrii de recunoaștere sînt modificați, ceea ce se petrece foarte rar în condiții naturale.

Rezultatele obținute pînă în prezent au arătat că reacțiile *in vitro* sînt foarte asemănătoare cu cele *in vivo*. Aceste constatări au demonstrat că recunoașterea implică ambele catene ale duplexului și că secvențele heteroduplex $s^m : s$ nu corespund din punct de vedere al restricției.

În această discuție s-a presupus că ambele procese — de restricție și de modificare — sînt îndeplinite de una și aceeași enzimă nativă. Faptul s-a dovedit real *in vitro*, dar s-ar putea ca să existe totuși diferențe față de procesele care au loc în celulele vii.

E. *Modificarea prin metilare*. Mecanismul acestui proces nu se cunoaște încă. Probabil că una dintre moleculele de SAM, legate de enzimă în cursul procesului de activare, devine donor de grupări metil în cursul acestei reacții. Pentru modificarea heteroduplexului $s^m : s$ pare suficientă o singură moleculă. Nu se știe încă sub ce formă și în ce moment enzima părăsește DNA și, dacă, eventual, ea mai poate interacționa încă odată.

F. *Migrarea la situsul de clivaj*. În contrast cu modificarea, hidroliza nu are loc la centrul de recunoaștere. Se poate presupune că enzima, după ce a ales calea de restricție pentru acțiunea ei ulterioară, migrează de-a lungul duplexului, de la centrul de recunoaștere spre situsul de rupere. Această deplasare necesită consum de energie, pe care o poate furniza ATP. S-au propus două modele pentru realizarea acestei migrări (fig. 19) (Arber și colab., 1974).

În modelul *A* se presupune că enzima se desprinde total de pe secvența de recunoaștere din duplex și că apoi migrează spre situsul de clivare (de hidroliză). Conform modelului *B*, enzima rămîne atașată la

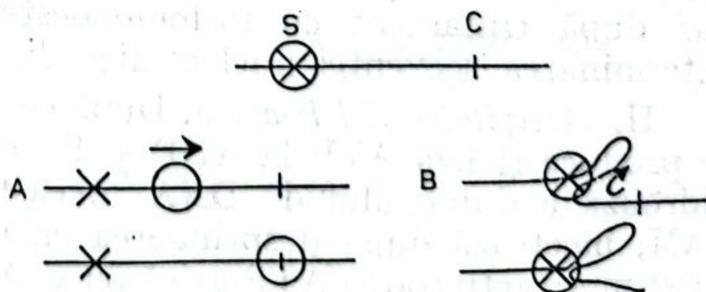


Fig. 19. Migrarea endonucleazei de restricție *R.K* de la centrul de recunoaștere S la cel de rupere C: A) enzima se detașează de pe S; B) enzima rămîne atașată la S (după *Arber* și colab., 1974).

situsul de recunoaștere, iar trecerea la centrul de rupere (de clivare) s-ar realiza prin plierea duplexului de DNA; odată trecută de la *S* la *C*, enzima ar putea începe procesul de restricție. Deocamdată nu există dovezi experimentale pentru nici unul dintre modelele propuse, iar — pe de altă parte — s-ar putea ca în realitate transferul enzimei de la un centru la celălalt să se realizeze pe o altă cale, încă necunoscută.

Ar mai fi şi problema conformaţiei pe care o dobîndeşte centrul de recunoaştere după ce enzima a optat pentru calea acţiunii de restricţie. Studiile întreprinse asupra produselor-limită ce se obţin la digestia cu endonucleazele de restricţie Eco *R.K* şi Eco *R.B* a diferitelor substraturi de DNA au arătat că orice secvenţă nucleotidică de recunoaştere poate servi ca semnal pentru enzimă o singură dată sau, în orice caz, de un număr limitat de ori. Explicaţia fenomenului nu se cunoaşte. O posibilitate ar putea reieşi din modelul *B* (fig. 18), alta ar consta în alterarea centrului de recunoaştere, dar nu există încă dovezi că acesta ar suferi o metilare.

Dacă centrul de recunoaştere ar fi alterat în cursul procesului de recunoaştere, s-ar pune problema şi a existenţei unor posibile procese de restaurare a acestui centru în molecula nativă. S-ar putea ca acest proces de reparare a DNA să aibă loc în cursul unor mutaţii.

G. *Ruperea duplexului de DNA*. Clivarea celor două catene ale DNA are loc în etape. O cantitate mică de enzimă produce crestături (tăieturi) numai pe una dintre catene; o concentraţie mare de enzimă rupe ambele catene, dar şi în acest caz au putut fi izolaţi intermediari cu o singură catenă hidrolizată. Practic, pentru ruperea duplexului, ar putea fi necesare două molecule de enzimă. În prezent, există dovezi experimentale obţinute cu ajutorul endonucleazelor de restricţie izolate din diverse tulpini mutante şi care vin în sprijinul acestei ipoteze.

Independent de mecanismul foarte precis prin care ar avea loc această „complementare“ *in vivo*, experimentele realizate *in vitro* au permis să se adopte părerea că mersul normal al reacţiei de restricţie constă în activare şi recunoaştere numai prin intermediul unei singure molecule de enzimă activată şi că, ulterior, o nouă moleculă de enzimă, care nu mai este necesar a fi activată de către SAM, se ataşază complexului deja existent şi catalizează următoarea reacţie, necesară pentru clivarea ambelor catene din duplexul de DNA.

Din motive necunoscute pînă în prezent, capetele fragmentelor rezultate la tăiere nu pot fi fosforilate sub acţiunea polinucleotidkinazei, nici după tratament cu fosfomonoesterază. Acest fapt face dificilă determinarea secvenţei nucleotidice din centrul de clivare.

H. *Activitatea ATP-azică*. După ce enzima alege calea de restricţie, se produce şi liza ATP la ADP şi P_i, care continuă pînă la completa hidroliză a duplexului de DNA. Această activitate, care nu necesită SAM, încetează după desprinderea enzimei de restricţie de DNA. În acest mod, activitatea ATP-azică pare să fie o consecinţă a modificărilor secvenţiale pe care le suferă enzima. Nu se ştie deocamdată dacă efectul se datoreşte unui complex DNA-enzimă întreagă sau unui complex DNA-fragment enzimatic. De asemenea, încă nu s-a stabilit dacă efectul ATP-azic se petrece şi *in vivo*.

I. *Absenţa turnover-ului în activitatea de restricţie*. Activitatea ATP-azică sugerează că, după ruperea DNA, enzima sau o parte a ei rămîne

încă atașată de acidul nucleic hidrolizat. Se pare că fiecare enzimă intervine o singură dată în procesul de restricție și că în cursul acestuia este așa de tare alterată că nu mai poate hidroliza DNA.

Așa stînd lucrurile, se pune problema dacă termenul de „enzimă" este corect pentru endonucleazele *R.K* și *R.B*, cel puțin.

Deci, endonucleazele de restricție de tip I reprezintă un sistem complex de compuși cu masă moleculară mare și care, pentru a-și exercita acțiunea reclamă prezența unor efectori, care prin interacțiune cu „enzima" îi induc unele modificări funcționale.

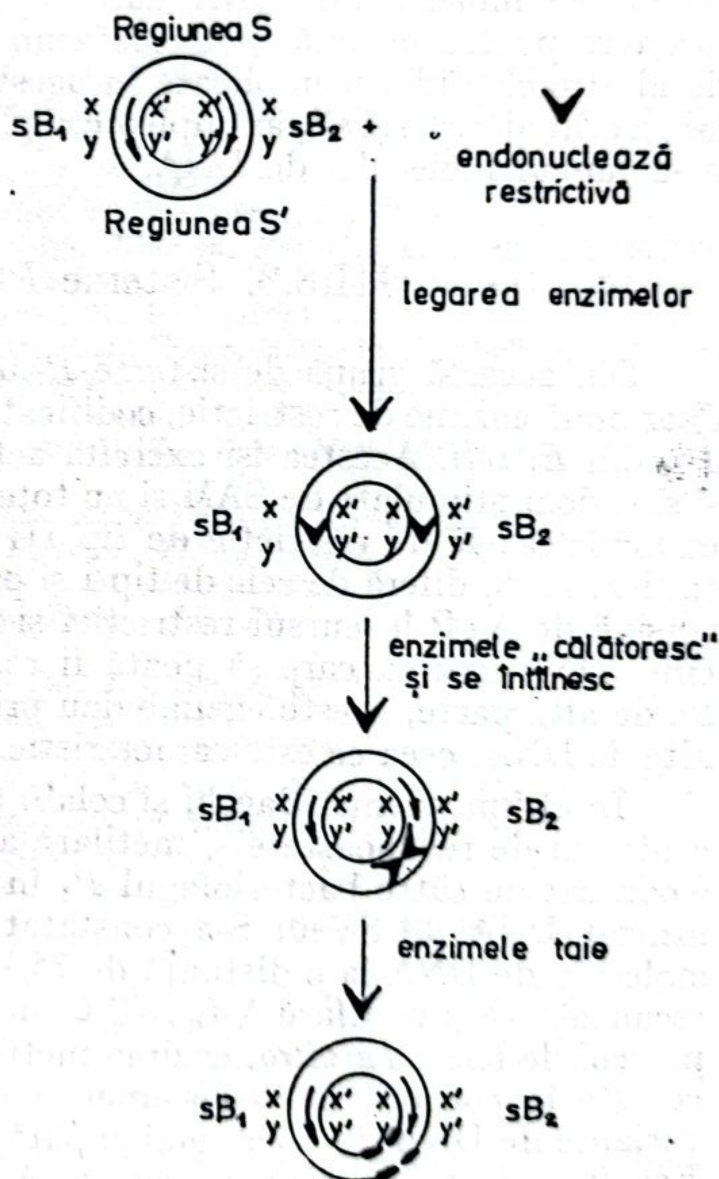


Fig. 20. Model pentru mecanismul de acțiune a enzimelor de restricție de tip I (după *Schulman*, 1974).

III.3.2.2. Mecanismul de acțiune al enzimelor de restricție de tip I. Pentru a explica mecanismul de acțiune al endonucleazelor de restricție de tip I, la care nu există identitate între centrul de recunoaștere pentru enzimă și locul unde aceasta își exercită acțiunea hidrolitică asupra moleculei bicatenare de DNA, Shulman (1974) a propus un model, pe care l-a denumit „al enzimelor călătoare" *(wandering enzymes)* (fig. 20).

Conform acestui model există o secvență de recunoaștere, specifică, asimetrică și nemodificată care permite legarea a două molecule de endonuclează de restricție la DNA, în zonele sB_1 și sB_2. Odată legate, moleculele de enzimă încep să „călătorească" de-a lungul moleculei circulare, bicatenare de DNA, în funcție de orientarea pe care le-a imprimat-o centrul de recunoaștere. „Călătoria" se încheie la întîlnirea cap-la-cap a celor două molecule enzimatice. Aceasta ar reprezenta semnalul pentru tăierea duplexului de DNA. După ce are loc prima crestare a moleculei bicatenare, moleculele enzimatice nu vor mai putea „călători" la fel de ușor, ceea ce duce la limitarea situsurilor de rupere. Între cele două regiuni ale moleculei de DNA, care împreună alcătuiesc situsul de recunoaștere pentru enzimă, pot exista un număr relativ mare și variabil de alte nucleotide, neimplicate în acest proces. Modificarea prin metilare a centrilor sB_1 și sB_2 ar împiedica „plimbarea" moleculelor enzimatice de-a lungul moleculei de DNA.

III.3.3. Sisteme *R-M* de tip III

Din această grupă de sisteme *R-M* pentru moment s-au semnalat doar două enzime de restricție, codificate de bacteriofagul P_1 și plasmida P_{15} din *E. coli*. Acestea își exercită acțiunea în prezența ATP și Mg^{2+} și sînt doar stimulate de SAM și nu total dependente de acesta. În plus, endonucleazele de restricție de tip III (identificate de Kauc și Piekarowicz, 1978) diferă de cele de tip I și prin aceea că nu induc o hidroliză masivă de ATP în cursul restricției și nici nu formează complecși specifici DNA-enzimă care să poată fi reținuți pe filtre de nitroceluloză. Pe de altă parte, aceste enzime dau prin hidroliză fragmente bine definite de DNA, ceea ce este caracteristic enzimelor de restricție de tip II.

În ultima vreme, Baechi și colab. (1979) au adus lămuriri și asupra centrului de recunoaștere și metilare al sistemului *R-M* de tip Eco P_1 (codificat de către bacteriofagul P_1 în *E. coli* lizogen). Ca substrat s-a utilizat DNA de SV40. S-a constatat că enzima hidrolizează macromolecula de DNA la o distanță de 25—27 perechi de baze de situsul de recunoaștere și metilare A-G-A-C-C, în direcția 3', cu o variație de 2—4 perechi de baze. *In vitro*, enzima metilează doar o singură catenă, ceea ce este în concordanță cu asimetria centrului de recunoaștere. Unele variante de DNA de SV40 mai capătă cîte un centru de rupere pentru Eco P_1, prin trecerea unei secvențe A-G-A-A-C în A-G-A-C-C.

Bibliografie

1. Arber, W., *Pathol. Microbiol.* **14**, 127 (1962).
2. Arber, W., *J. Mol. Biol.*, **11**, 247 (1965).
3. Arber, W., *Trends Biochem. Sci.*, august (1977).
4. Arber, W., *Angew. Chem.*, **17**, 73 (1978).

5. Arber, W., Dussoix D., *J. Mol. Biol.*, **5**, 18 (1962).
6. Arber, W., Kühnlein U., *Pathol. Microbiol.*, **30**, 946 (1967).
7. Arber, W., Linn, S., *Annu. Rev. Biochem.*, **38**, 467 (1969).
8. Arber, W., Yuan, R., Bickle, T.A., *FEBS Meet. Proc.*, (publ. 1975), p. 3 (1974).
9. Baechi, B., Reiser, J., Pirrotta V., *J. Mol. Biol.*, **128**, 143 (1979).
10. Bertani, G., Weigle, J.J., *J. Bacteriol.*, **64**, 557 (1953).
11. Bigger, A.H., Murray, K., Murray, N.E., *Nature New Biol.*, **244**, 7 (1973).
12. Boyer, H.W., *J. Bacteriol.*, **88**, 1652 (1974).
13. Boyer, H.W., *Annu. Rev. Bacteriol.*, **25**, 153 (1971).
14. Boyer, H.W., Chow, L.T., Dugaiczyk, A., Hedgpeth, J., Goodman, H.M., *Nature New Biol.*, **244**, 40 (1973).
15. Boyer, H.W., Greene, P.J., Meagher, R.B., Betlach, M.C., Russell, D., Goodman, H.M., *FEBS Meet. Proc.*, (publ. 1975), p. 23 (1974).
16. Brown, N.L., Smith, M., *FEBS Lett.*, **65**, 284 (1976).
17. Danna, K.J., Nathans, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **68**, 2913 (1971).
18. Dugaiczyk, A., Hedgpeth, J., Boyer, H.W., Goodman, H.M., *Biochemistry*, **13**, 503 (1974).
19. Dussoix, D., Arber, W., *J. Mol. Biol.*, **5**, 37 (1962).
20. Engberg, J., Klenow, H., *Trends Biochem. Sci.*, august (1977).
21. Garfin, D.E., Goodman, H.M., *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **59**, 108 (1974).
22. Glover, S., Schell, J., Symonds, N., Stacey, K.A., *Genet. Res.*, **4**, 480 (1963).
23. Gough, M., Lederberg, S., *J. Bacteriol.*, **91**, 1460 (1966).
24. Greene, P.J., Betlach, M.C., Goodman, H.M., Boyer, H.W., în *„Methods in molecular biology"*, ed. R.B. Wickner, Marcel Dekker Inc., New York (1974).
25. Hartman, M., Zinder, N.D., *J. Mol. Biol.*, **85**, 345 (1974).
26. Hedgpeth, J., Goodman, H.M., Boyer H.W., *Proc. Natl. Acad. Sci, (U.S.A.)*, **69**, 3448 (1972).
27. Horiuchi, K., Zinder, N.D., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **69**, 3220 (1972).
28. Kauc, L., Piekarowicz, A., *Eur. J. Biochem.*, **92**, 417 (1978).
29. Kelly, T.J., Smith, H.O., *J. Mol. Biol.*, **51**, 393 (1970).
30. Kleid, D., Humayun, Z., Jeffrey A., Ptashne M., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **73**, 293 (1976).
31. Koncz, Cs., Kiss, A., Venetianer P., *Eur. J. Biochem.*, **89**, 523 (1978).
32. Kühnlein, U., Arber, W., *J. Mol. Biol.*, **63**, 1 (1972).
33. Lacks, S., Greenberg, B., *J. Biol. Chem.*, **250**, 4060 (1973).
34. Linn, S., Lautenberger, J.A., Eskin, B., Lacky, D., *Fed. Proc.*, **33**, 1128 (1974).
35. Linn, S., Arber, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **59**, 1300 (1968).
36. Luria, S.E., Human, M.L., *J. Mol. Biol.*, **5**, 37 (1952).
37. Mamelak, L., Boyer, H.W., *J. Bacteriol.*, **91**, 1460 (1970).
38. Meselson, M., Yuan, R., Heywood, J., *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 447 (1972).
39. Meselson, M., Yuan, R., *Nature*, **217**, 1110 (1968).
40. Middleton, J.H., Edgell, M.H., Hutchinson C.A., *J. Virol.*, **10**, 42 (1972).
41. Modrich, P., Zabel, D., *J. Biol. Chem.*, **251**, 5866 (1976).
42. Murray, K., Hughes, S.G., Brown, J.S., Bruce, S.A., *Biochem. J.*, **156**, 317 (1976).
43. Old, R., Murray, K., Roizes, G., *J. Mol. Biol.*, **92**, 331 (1975).
44. Pittard, J., *J. Bacteriol.*, **87**, 1256 (1964).
45. Polisky, B., Greene, P.J., Garfin, D.E., McCarthy, B.J., Goodman, H.M., Boyer, H.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **72**, 3310 (1975).
46. Ravetch, J.V., Horiuchi, K., Zinder, N.D., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **75**, 2266 (1978).
47. Roberts, R.J., în *„Recombinant molecules: impact on science and society"*, ed. R.F. Beers jr. & E.G. Basset, Raven Press, New York (1978).
48. Roberts, R.J., *C.R.C. Crit. Rev. Biochem.*, **4**, 123 (1976).
49. Roberts, R.J., Breitmayer, J.B., Tabachnik, N.F., Myers P.A., *J. Mol. Biol.*, **91**, 121 (1975).
50. Roberts, R.J., Myers, P.A., Morrison, A., Murray, K., *J. Mol. Biol.*, **102**, 157 (1976a).

51. Roberts, R.J., Myers, P.A., Morrison, A., Murray, K., *J. Mol. Biol.*, **103**, 199 (1976b).
52. Roulland-Dussoix, D., Yoshimori, R., Greene, P.J., Betlach, M.C., Goodman, H.M., Boyer, H.W., în „*Bacterial plasmid conference*" (Am. Soc. Microbiol.) (1974).
53. Roy, P.H., Smith, H.O., *J. Mol. Biol.*, **81**, 445 (1973).
54. Sharp, P.A., Sugden, B., Sambrook, J., *Biochemistry*, **12**, 3055 (1973).
55. Shulman, M.J., *Nature*, **252**, 76 (1974).
56. Smith, D.J., Arber, W., Kühnlein, U., *J. Mol. Biol.*, **63**, 9 (1972).
57. Smith, D.J., Blattner, F.R., Davies, J., *Nucleic Acids Res.*, **3**, 343 (1976).
58. Smith, H.O., Wilcox, K.W., *J. Mol. Biol.*, **51**, 379 (1970).
59. Smith, L.A., Chirikjan, J.G., *J. Biol. Chem.*, **254**, 1003 (1979).
60. Smith, H.O., Nathans, D., *J. Mol. Biol.*, **81**, 419 (1973).
61. Subramanian, N.K., Pan, J., Zain, S., Weissman, S.M., *Nucleic Acids Res.*, **1**, 3123 (1974).
62. Tiollais, P., Rambach, A., *La Recherche*, **82**, 821 (1977).
63. Vovis, G.F., Horiuchi, K., Hartman, N., Zinder, N.D., *Nature New Biol.*, **246**, 13 (1973).
64. Watanabe, T., Nishida, H., *Med. Biol.*, **67**, 96 (1963).
65. Watson, J.D., Crick, F.C.H., *Nature*, **171**, 737 (1953).
66. Weiss, B., Richardson, C.C., *J. Mol. Biol.*, **23**, 405 (1967).
67. Wood, W.B., *J. Mol. Biol.*, **16**, 118 (1966).
68. Yoshimori, R., Roulland-Dussoix, D., Boyer, H.W., *J. Bacteriol.* **112**, 1275 (1972).
69. Yuan, R., Reiser, J., *J. Mol. Biol.*, **122**, 433 (1978).

Scanned with CamScanner

IV. DNA-ligazele

Introducerea „pasagerului" în „vehicul", cu alte cuvinte „lipirea" genei de interes într-un anumit loc din replicon, a devenit posibilă datorită utilizării în practica de laborator a noi „instrumente" de lucru şi anume endonucleazele de restricţie — care taie DNA-vehicul în locuri bine determinate (v. cap. „Enzimele de restricţie") — şi a enzimelor numite polinucleotidsintetaze sau, mai simplu, *DNA-ligaze* — care sudează covalent fragmentele de DNA. În general, *sintetazele* sau *ligazele* sînt enzime care catalizează reacţii de sinteză, folosind energia eliberată prin scindarea hidrolitică a unor legături macroergice.

DNA ligazele (întîlnite în literatura de specialitate şi ca *sealases* sau *DNA joining enzymes*) catalizează formarea unor legături covalente fosfodiesterice între capetele 3′-hidroxil şi 5′-fosfat ale unor fragmente de DNA dublu catenar, concomitent cu ruperea unor legături pirofosforice din NAD^+ sau din ATP, ca furnizori de energie.

Impulsul pentru studiul acestor enzime a fost imprimat de două fapte experimentale observate la începutul deceniului al şaptelea al secolului nostru şi anume: 1) Meselson şi Weigle (1961), precum şi Kellenberg şi colab. (1961) au arătat că recombinarea genetică are loc prin ruperea şi relegarea moleculelor de DNA ; 2) Young şi Sinsheimer (1964), pe de o parte, şi Bode şi Kaiser (1965), pe de altă parte, au constatat că după ce bacteriofagul λ infectează bacteria *E. coli* o mare parte din DNA-ul său liniar este convertit într-un duplex de tip *CCI* (cerc covalent închis). Aceste fapte au sugerat că în celulă trebuie să existe un mecanism de legare enzimatică a lanţurilor polideoxiribonucleotidice.

În 1967 a avut loc, independent şi aproape simultan în nu mai puţin de cinci laboratoare (Cozzarelli şi colab., 1967; Gefter şi colab., 1967; Gellert, 1967; Olivera şi Lehman, 1967; Weiss şi Richardson, 1967), descoperirea enzimelor implicate în procesele amintite mai sus, anume a DNA-ligazelor, în celulele de *E. coli* neinfectate sau infectate cu bacteriofagul *T*4. Identificarea acestor enzime a coincis şi cu ipoteza făcută de Okazaki şi colab. (1968), pentru un mecanism de repli-

care discontinuă a DNA, prin fragmente scurte, care se unesc ulterio- cu formarea unui lanţ continuu. Odată cu acceptarea acestui model de replicare a fost recunoscut definitiv rolul DNA ligazei ca parte integrantă a mecanismelor de replicare celulară.

După descoperirea ligazelor în celulele de *E. coli* neinfectate şi infectate cu bacteriofagi, activităţi similare de legare a fragmentelor de DNA (la capetele 3'-hidroxil şi 5'-fosfat) au mai fost observate într-o mare varietate de ţesuturi de organisme eucariote. Astfel, Lindhal şi Edelman (1968) au pus în evidenţă activitatea DNA ligazică în splina, timusul şi măduva osoasă de iepure, Tsukada şi Ichimura (1971) în ficatul de şobolan, în timp ce Howell şi Stern (1971) au identificat această activitate în microsporocitele de crin. De asemenea, activitatea DNA ligazică a fost detectată la virusul sarcomului Rous de către Mizutani şi colab. (1971), precum şi în extractele celulare cu o creştere rapidă. Lindhal a găsit un înalt nivel de activitate DNA ligazică în extractele de splină de porc, oaie sau viţel, precum şi în mieloame murine (Lindhal, 1971). Aceste date arată larga răspîndire a DNA-ligazelor în organismele eucariote şi procariote.

La ora actuală, ligazele cele mai bine caracterizate şi care au găsit o largă utilizare în tehnologia DNA recombinant sînt cele de natură bacteriană, izolate din tulpini de *E. coli*, neinfectate şi infectate cu bacteriofagul *T*4. Ambele enzime au putut fi obţinute în cantităţi suficiente şi sub formă omogenă. Amîndouă aceste ligaze catalizează sinteza unor legături fosfodiesterice între capete cu grupări 3'-hidroxil şi 5'-fosfat adiacente, din duplexul de DNA. Asupra acestor enzime ne vom opri pe larg în cele ce urmează.

Din punctul de vedere al clasificării lor conform normelor stabilite de către Comisia de Enzimologie a Uniunii Internaţionale de Biochimie (I.U.B.), DNA-ligazele sînt codificate ca subclasa E.C.6.5., adică ligaze care formează legături de tip P-O.

IV.1. Mecanismul de acţiune

Sinteza legăturii fosfodiesterice într-un duplex de DNA care are o catenă crestată *(nicked)* are loc, indiferent de tipul de ligază implicat — cea din *E. coli* neinfectată sau cea indusă în *E. coli* de infecţia cu bacteriofag *T*4 — printr-o reacţie cu trei etape, care implică formarea a doi compuşi intermediari covalenţi (fig. 21).

În cazul DNA-ligazei din *E. coli* infectată cu bacteriofag *T*4 — pe scurt *T*4 ligaza — prima etapă a reacţiei constă din interacţiunea enzimei cu ATP, ca furnizor de energie şi donor de grupări adenil. În urma acestei interacţiuni se formează adenilatligaza şi acidul pirofosforic (PP_i). În etapa următoare, gruparea adenil este transferată la DNA, obţinîndu-se

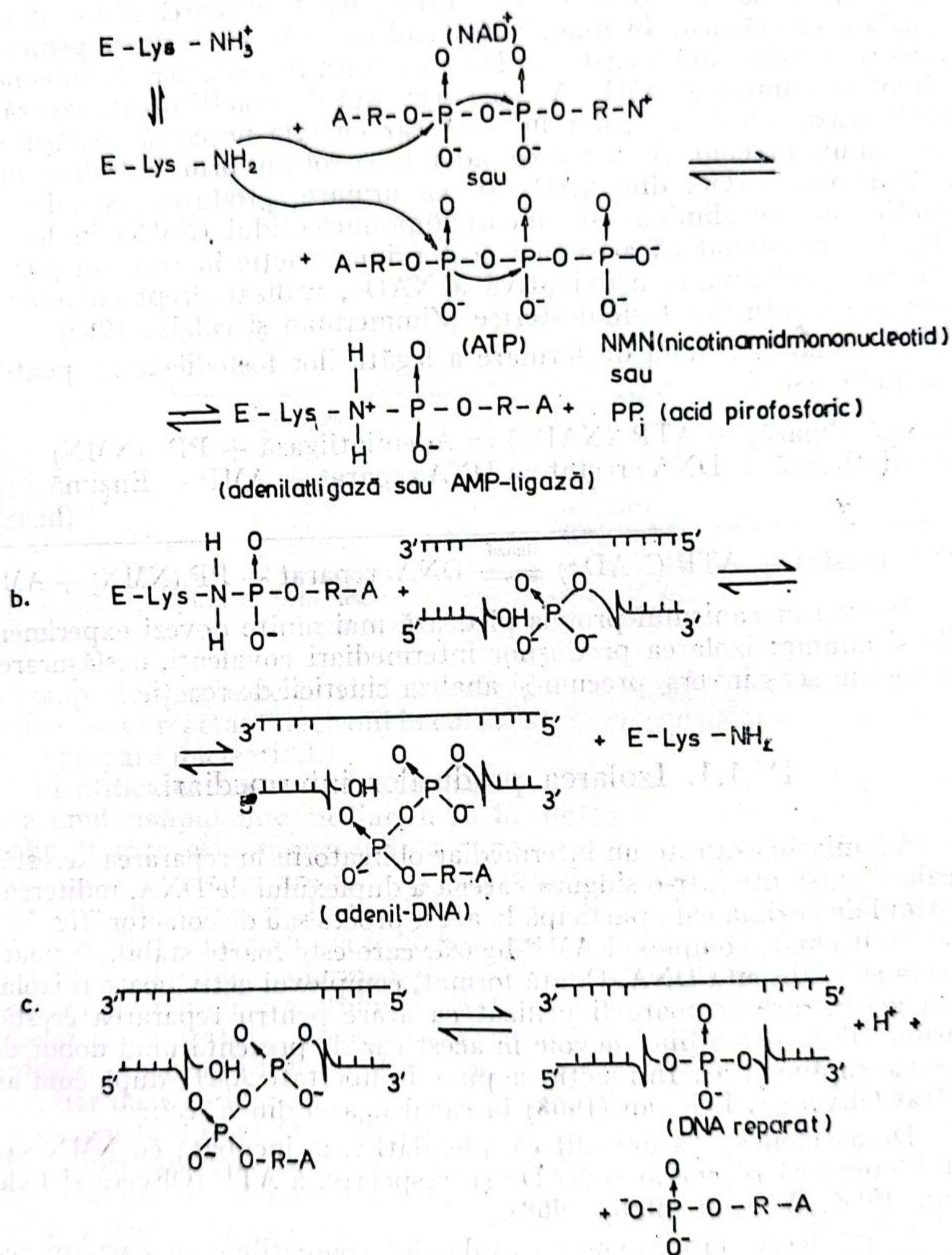
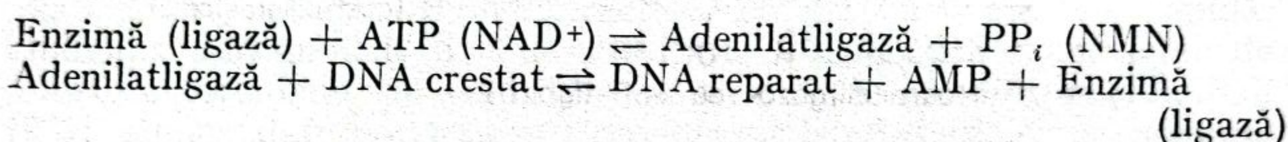


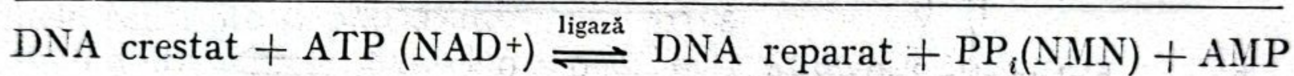
Fig. 21. Mecanismul de acţiune al DNA-ligazelor:
a) formarea adenilatligazei (enzima activă); b) formarea adenil-DNA; c) formarea legăturii fosfodiesterice (după *Modrich* şi *Lehman*, 1973).

o legătură nouă, de tip pirofosfat, între AMP și gruparea 5'-fosfat terminală a crestăturii. În final, 5'-fosfatul este atacat de către gruparea 3'-hidroxil adiacentă, constituindu-se legătura fosfodiesterică, iar concomitent se elimină și AMP. Aceeași secvență de reacții o catalizează și DNA-ligaza din *E. coli*, dar în acest caz energia necesară desfășurării procesului, precum și gruparea adenil, se obțin prin hidroliza unei legături macroergice din NAD^+ și, ca urmare, produsul secundar de reacție care se elimină este nicotinamidnucleotidul (NMN) în loc de PP_i. De menționat că aceasta a fost prima reacție în care s-a pus în evidență participarea neoxidativă a NAD^+, utilizat drept cofactor la formarea legăturilor fosfodiesterice (Zimmerman și colab., 1967).

Schematic, reacția de formare a legăturilor fosfodiesterice poate fi rezumată astfel:



Enzimă (ligază) + ATP (NAD^+) $\rightleftharpoons$ Adenilatligază + PP_i (NMN)
Adenilatligază + DNA crestat $\rightleftharpoons$ DNA reparat + AMP + Enzimă (ligază)



DNA crestat + ATP (NAD^+) $\xrightleftharpoons{\text{ligază}}$ DNA reparat + PP_i(NMN) + AMP

Pentru mecanismul propus pledează mai multe dovezi experimentale și anume: izolarea produșilor intermediari covalenți, desfășurarea reacției în sens invers, precum și analiza cineticii de reacție.

IV.1.1. Izolarea produșilor intermediari

Adenilatligaza este un intermediar obligatoriu în repararea „crestăturilor" existente într-o singură catenă a duplexului de DNA, indiferent de tipul de enzimă care participă la acest proces sau de cofactor (fig. 21). Mai mult chiar, complexul AMP-ligază, care este foarte stabil, se poate forma și în absența DNA. Odată format, complexul activ poate fi izolat prin gel-filtrare și poate fi utilizat ca atare pentru repararea crestăturilor DNA, nemaifiind nevoie în acest caz de prezența unui donor de energie suplimentar. În reacție se pune în libertate AMP, după cum au arătat Olivera și Lehman (1968) în cazul ligazei din *E. coli*.

De asemenea, s-a dovedit că adenilatligaza incubată cu NMN sau PP_i determină regenerarea NAD^+ și, respectiv, a ATP (Olivera și Lehman, 1968; Weiss și colab., 1968).

Toate aceste fapte experimentale sînt compatibile cu participarea adenilatligazei la reacția de sinteză a legăturilor fosfodiesterice.

Studiul structurii complexului activat — adenilatligaza — realizat de către Gumport și Lehman (1971) a precizat că între enzimă și AMP se formează o legătură fosfodiamidică, prin atacul nucleofil al grupării ε-amino a lizinei din constituția ligazei asupra grupării fosforice a AMP

(fig. 22). Acest tip de complex s-a pus în evidență atît pentru DNA-ligaza din celulele neinfectate de *E. coli*, cît și pentru DNA-ligaza indusă de bacteriofagul *T4* în celulele de *E. coli*. Ca atare aceste două ligaze au

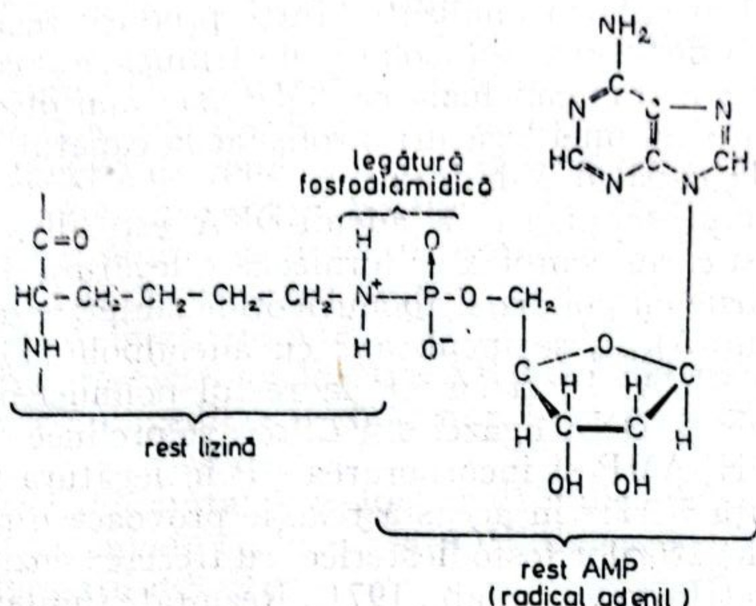


Fig. 22. Structura complexului activat adenilat-ligază, prin legarea grupării ε-NH_2 a lizinei din ligază cu restul fosfat din AMP.

un comportament unic în rîndul enzimelor, folosind gruparea ε-amino a lizinei drept reactant nucleofil în cursul unei reacții enzimatice cu transfer de grupare nucleotidil.

Identificarea legăturii fosfodiamidice (fig. 22) s-a făcut după izolarea unui compus intermediar, labil în mediu acid și stabil în mediu alcalin și care este susceptibil la rupere cu hidroxilamină în mediu acid. Această comportare face ca legătura fosfodiamidică să se deosebească de alte tipuri de legături care s-ar putea forma între enzimă și restul de AMP, cum ar fi cea fosfodiesterică sau cea de anhidridă mixtă.

Cel de al doilea intermediar covalent, adenil-DNA (fig. 21), se formează prin legarea restului de AMP din adenilatligază la capătul 5'-fosfat al crestăturii, concomitent cu apariția unei legături de tip pirofosfat. În condiții de stare staționară acest complex nu se acumulează, dar dacă se lucrează cu un exces de enzimă la 0°C după o incubare de scurtă durată (30 secunde) cu NAD^+, respectiv ATP, se poate izola o mică cantitate din acest compus (Olivera și colab., 1968; Wang, 1971). Complexul adenil-DNA a mai putut fi obținut și prin reacția inversă, pornind direct de la AMP și DNA (fig. 20). Dacă adenil-DNA reacționează cu capătul 3'-hidroxil al catenei neadenilate din crestătura DNA se formează legături fosfodiesterice în absența substanțelor macroergice și se eliberează AMP.

Pentru identificarea tipului de legătură prin care se formează complexul adenil-DNA, acesta a fost denaturat și tratat apoi cu exonuclează I

(Olivera și colab., 1968). Se știe că această enzimă degradează DNA monocatenar în mod secvențial, începînd cu capătul 3'-hidroxil, cu formare de 5'-mononucleotide și a unui dinucleotid, corespunzător capătului 5'-terminal al catenei analizate. Între produșii reacției de hidroliză a adenil-DNA denaturat s-a izolat și un trinucleotid care avea AMP legat 5'. De aici s-a tras concluzia că AMP este mai degrabă legat de DNA prin intermediul unei legături pirofosfat la capătul 5'-fosfat, decît ca fosfodiester la capătul 3'-hidroxil.

În sprijinul presupunerii că adenil-DNA este direct implicat în reacția ligazică și că în complex se formează o legătură de tip pirofosforic vin și lucrările cu polideoxiribonucleotide sintetice de tip poli(dT). Astfel, dacă poli$(dA)_{5000}$ se incubează cu adenilpoli$(dT)_{200}$ marcat cu tritiu la AMP ($[^3H]$-AMP) și cu ^{32}P la restul polinucleotidic (5'-$[^{32}P]$-poli(dT)) în prezența DNA-ligazei din *E. coli* se produce eliberarea stoichiometrică a $[^3H]$-AMP și incorporarea ^{32}P în legătura fosfodiesterică (fig. 23). Prezența NAD^+ în această reacție provoacă o puternică inhibiție a formării legăturilor fosfodiesterice, cu trecerea enzimei sub forma de adenilatligază (Harvey și colab., 1971). Rezultate similare s-au obținut și cu DNA-ligaza indusă de bacteriofagul *T4*.

Formarea unei legături pirofosforice la capătul 5'-fosfat al leziunii din catena DNA nu înseamnă în mod automat implicarea sa într-o

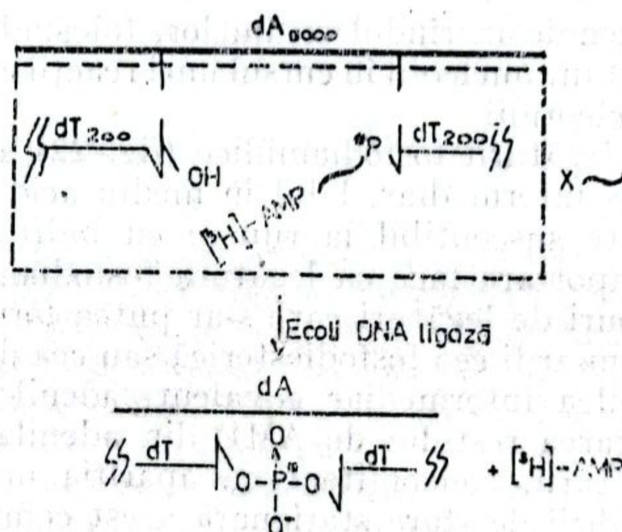


Fig. 23. Sinteza legăturii diesterice și eliberarea AMP din poli(dT)-adenil, pus în prezența poli(dA) și a DNA-ligazei din *E. coli* (după *Lehman*, 1974).

reacție de tip ligazic, aceasta deoarece DNA-ligazele manifestă o specificitate ridicată pentru restul de adenină existent în intermediarul covalent adenil-DNA (Olivera și Lehman, 1968). Mai mult chiar, Harvey și colab. (1971) au arătat că înlocuirea AMP cu dAMP reduce la 10% activitatea enzimei din *E. coli* infectată cu *T4*, iar GMP s-a dovedit cu totul ineficient în această reacție.

IV.1.2. Desfăşurarea reacţiei inverse

Studiul mecanismului de reacţie al DNA ligazelor a sugerat că, în reacţia inversă, ele s-ar putea comporta ca nişte endonucleaze AMP-dependente, adică odată ce ligaza determină formarea legăturilor fosfodiesterice înseamnă că ea ar putea să catalizeze la fel de bine şi ruperea lor, iar cele două activităţi ale sale — de scindare şi de legare — se vor manifesta în funcţie de condiţiile în care este pusă să lucreze.

Această comportare a fost postulată de către Wang (1971), pentru a putea explica modul de acţiune al proteinei ω din celulele de *E. coli*, avînd proprietatea să provoace desrăsucirea duplexului negativ superîncolăcit de DNA în conformaţia *CCI*.

Atît activitatea endonucleazică AMP-dependentă, cît şi relaxarea superhelixului s-a dovedit a fi chiar o măsură a reversibilităţii reacţiei ligazice.

Experienţele au arătat într-adevăr că moleculele *CCI* de DNA din bacteriofagul λ incubate cu ligază şi AMP dau naştere la molecule noi, cu două conformaţii diferite:

— molecule circulare deschise (*CD*), cu o singură crestătură, numai pe o singură catenă;

— molecule *CCI* care s-au relaxat, pierzîndu-şi starea de superîncolăcire.

Aceste forme moleculare s-au pus în evidenţă prin ultracentrifugare în gradient de CsCl a moleculelor *CCI* incubate în prezenţa ligazei şi a AMP (fig. 24).

Viteza reacţiei inverse este foarte mică, iar punerea ei în evidenţă se face numai în prezenţa unor cantităţi mari de enzimă. Folosirea

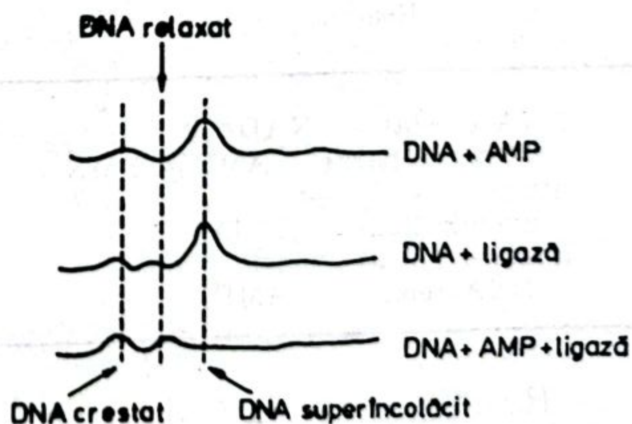


Fig. 24. Conversia AMP-dependentă a DNA superîncolăcit din bacteriofagul λ la forma relaxată şi crestată sub acţiunea DNA-ligazei (după *Modrich* şi colab., 1972).

^{32}P-AMP permite identificarea adenil-DNA şi a adenilatligazei, produşi intermediari care apar şi în reacţia inversă, ceea ce aduce noi argumente în favoarea mecanismului de reacţie prezentat anterior (fig. 21).

Relaxarea sub acţiunea ligazelor a DNA superîncolăcit diferă de relaxarea catalizată de proteina ω, amintită mai sus, din mai multe puncte de vedere, cel mai important fiind însă dependenţa absolută a

reacţiei de prezenţa AMP. De asemenea, mai există diferenţe de specificitate şi de cinetică enzimatică: ligaza relaxează atît DNA superîncolăcit spre dreapta (notat convenţional cu semnul (—)), cît şi pe cel superîncolăcit spre stînga (notat cu (+)), în timp ce proteina ω este inactivă faţă de superîncolăcirea spre stînga (+) (Wang, 1971).

IV.1.3. Analiza cineticii stării staţionare

Izolarea celor doi produşi intermediari covalenţi din reacţia ligazică — adenilatligaza şi adenil-DNA — care apar atît în reacţia directă, cît şi în cea inversă — confirmă, odată în plus, implicarea lor în sinteza legăturilor fosfodiesterice. Totuşi, dovada directă a participării lor la acest proces presupune ca cele două constante de viteză (a formării lor, precum şi a reacţiei următoare (fig. 20) să fie egale sau mai mari decît viteza sintezei legăturii fosfodiesterice. Adică, adenilatligaza şi adenil-DNA să constituie intermediari semnificativi din punct de vedere cinetic.

Rezultatele analizei cinetice a stării staţionare a reacţiei ligazice globale sînt date în tabelul 6. Legarea a fost măsurată cu ajutorul unui polideoxiribonucleotid sintetic de tip $(dA)_{5000} \cdot (dT)_{200}$, în care fragmentele de poli(dT) scurte sînt legate prin punţi de hidrogen la lanţul poli(dA), care este mult mai lung.

Tabelul 6

Constantele de viteză ale reacţiilor catalizate de *E. coli* ligază (după Lehman, 1974)

Reacţia	NH_4^+	Turnover (min^{-1})
DNA crestat + $NAD^+ \rightleftharpoons$ DNA reparat + AMP + NMN	—	1,4
	+	28,0
ligază + $NAD^+ \rightleftharpoons$ adenilatligază + NMN	—	60,0
	+	60,0
adenil-DNA $\rightleftharpoons$ DNA reparat + AMP	—	9,1
	+	10,0

Reacţia controlată de ligaza din *E. coli* este potenţată în mod specific de către concentraţiile mici de ioni NH_4^+ (1 mM). La o concentraţie de saturare (5—10 mM NH_4^+), viteza reală maximă (V_{max}) creşte de aproape 20 de ori faţă de viteza de reacţie în absenţa acestor ioni. În aceste condiţii K_M pentru NAD^+ s-a determinat a fi de 7 μM; K_M pentru crestăturile monocatenare are o valoare de 0,04—0,06 μM, iar turnover-ul se stabileşte la 28 legături fosfodiesterice pe minut (Modrich şi Lehman, 1973). Spre deosebire de DNA-ligaza din *E. coli*, care este

puternic activată de ionii NH_4^+, activitatea DNA-ligazei *T*4 nu este afectată de concentraţii de ioni NH_4^+ pînă la 10 mM.

Viteza de formare a adenilatligazei, măsurată prin schimb izotopic între restul de NMN marcat cu tritiu (din NAD^+ marcat) şi NAD^+ nemarcat este mai mare decît viteza de formare a legăturilor fosfodiesterice, care unesc marginile crestăturilor monocatenare din DNA; deci, adenilatligaza se poate forma cu o viteză suficient de mare pentru a putea fi regăsită ca produs intermediar în reacţia globală. Viteza reacţiilor parţiale nu este afectată de către ionii NH_4^+, ceea ce arată că activitatea are loc într-un moment situat după formarea adenilatligazei. O dovadă suplimentară a participării directe a adenilatligazei la sinteza legăturilor fosfodiesterice provine de la observaţia că reacţia de legare urmează o cinetică de tip „ping-pong", după cum reiese din reprezentarea inversului vitezei în funcţie de concentraţia substratului (Modrich şi Lehman, 1973) (fig. 25). Cea mai simplă interpretare a aspectului curbelor care prezintă aceeaşi pantă prevede o succesiune de reacţii parţiale cu formarea intermediară a unor complecşi sau a unor compuşi covalenţi ai enzimei cu grupări care trebuie transferate; în cazul de faţă adenilatligaza este complexul implicat.

Întrucît reacţia de formare a adenilatligazei este uşor reversibilă este de presupus că o parte semnificativă a energiei libere a legăturilor pirofosforice din NAD^+ este reţinută în intermediarul adenilat, ceea ce, dealtfel, corespunde cu existenţa în acest compus covalent a unei legă-

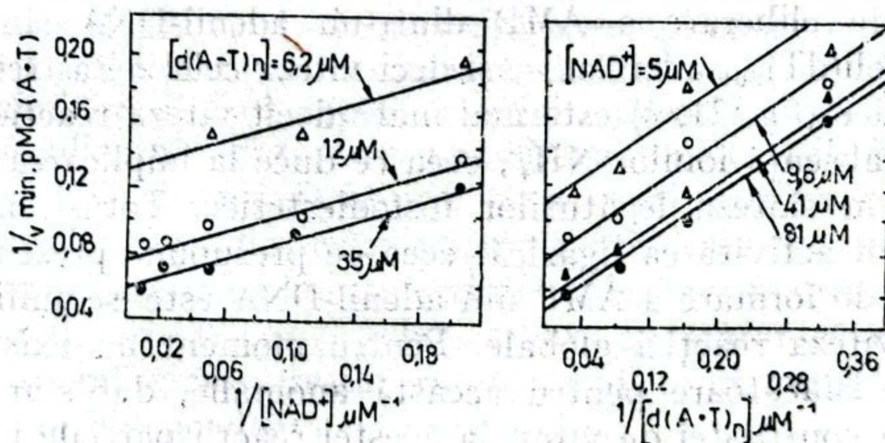


Fig. 25. Cinetica pe două substraturi a DNA-ligazei din *E. coli* (după *Modrich* şi *Lehman*, 1973).

turi fosfodiamidice macroergice, care leagă restul adenil de enzimă, prin intermediul grupărilor ε-NH_2 ale lizinei. Constanta de echilibru determinată pentru formarea adenilatligazei în condiţii standard de reacţie, adică la 30°C şi *p*H 8,0, a fost 28. Deoarece concentraţia intracelulară a NAD^+ din *E. coli* este cca 0,5 mM (London şi Knight, 1966), constanta de echilibru amintită sugerează că întreaga cantitate de ligază celulară ar fi sub formă activată, de adenilatligază.

Încercările întreprinse pentru a izola cea de a doua reacție din secvența de trei cîte cuprinde procesul de formare a legăturilor fosfodiesterice — este vorba de transferul AMP din adenilatligază la DNA și de determinarea constantei sale de viteză — au generat doar eșecuri. Deși, în condiții speciale de lucru — 0°C și *p*H 5,6 — adenil-DNA se poate izola în cursul reacției catalizată de DNA-ligaza *T*4 (Harvey și colab., 1971), totuși parametrii cinetici obținuți din aceste măsurători nu pot fi extrapolați pentru reacția ligazică propriu-zisă, care are loc la un *p*H și la o temperatură optime.

Pentru a bloca secvența reacțiilor ligazice la stadiul formării adenil-DNA este necesar să se folosească drept substrat un DNA crestat în care să lipsească complet gruparea 3′-hidroxil, care este esențială pentru formarea legăturilor fosfodiesterice. În prezența unui astfel de DNA reacția nu poate decurge mai departe de starea de activare a capătului 5′-fosfat, fapt dovedit de cercetări efectuate pe polinucleotide cu structură specifică. S-a lucrat pe un substrat sintetic cu perechi homopolimerice de tip $(dA)_{5000} \cdot (dT)_{200}$, în care lanțurile $(dT)_{200}$ aveau capete 3′-dideoxitimidilat. S-a constatat că viteza sintezei adenilat-DNA a fost foarte mică, în comparație cu viteza de legare a $(dT)_{200}$ cu grupări 3′-hidroxil. De aici s-a dedus concluzia că adenil-DNA este un intermediar obligatoriu în reacția catalizată de DNA-ligaze, iar grupările 3′-hidroxil sînt deosebit de importante chiar și pentru adenilarea grupărilor 5′-fosfat adiacente crestăturii.

Viteza de eliberare a AMP dintr-un adenil-DNA sintetic — și anume din poli$(dT)_{200}$-adenilat — și deci viteza celei de a treia etape a reacției ligazice (fig. 21, *c*) este mai mare decît viteza reacției globale, măsurată în absența ionilor NH_4^+, ceea ce duce la implicarea directă a adenil-DNA în sinteza legăturilor fosfodiesterice. Totuși, în condiții optime pentru activitatea ligazică, ceea ce presupune prezența ionilor NH_4^+, viteza de formare a AMP din adenil-DNA este semnificativ mai mică decît viteza reacției globale. Pentru moment nu există încă o explicație satisfăcătoare pentru această anomalie, dar s-ar putea ca determinarea constantei de viteză a acestei reacții parțiale în prezența ionilor NH_4^+ să ofere o alternativă interpretabilă.

Incubarea adenil-DNA cu ligază poate duce fie la sinteza legăturilor fosfodiesterice și la eliberarea AMP, fie la reacția inversă, de reformare a adenilatligazei, precum și a DNA cu crestătură monocatenară. Adenilatligaza liberă nu duce la eliberarea AMP din adenil-DNA (Hall și Lehman, 1969); dacă rolul ionului NH_4^+ ar consta în ușurarea disocierii adenilatligazei de pe DNA, s-ar produce implicit și inactivarea unei părți a enzimei. Într-adevăr, dacă adenil-DNA se incubează cu ligază și cu NMN în absența ionilor NH_4^+, întreaga cantitate de AMP se regă-

sește ca atare, liberă, deși se recuperează și o parte semnificativă a NAD+ (cca 20%). De aici se poate trage concluzia că ionii NH_4^+ facilitează disocierea adenilatligazei de pe DNA; această disociere ar trebui să explice și constanta de viteză anormal de mică în reacția de formare a AMP din adenil-DNA în prezența ionilor NH_4^+. O altă explicație, neconfirmată deocamdată, ar fi aceea că pentru legarea la adenil-DNA a ligazei neadenilate sînt necesare modificări conformaționale lente ale enzimei. Disocierea ligazei de pe adenil-DNA s-ar putea să nu decurgă normal înainte ca acest produs intermediar covalent să fie convertit la produșii finali, AMP și DNA cu crestătura din duplex reparată. Ca urmare, s-ar putea ca, lucrîndu-se cu un adenil-DNA sintetic incubat cu ligază, să apară o fază de legare lentă, care nu se produce atunci cînd enzima acționează în condiții catalitice normale și optime.

În ciuda acestor incertitudini, rezultatele cinetice — luate în ansamblu — corespund mecanismului propus pentru reacția ligazică, iar dovada că atît adenilatligaza, cît și adenil-DNA se acumulează în cursul reacției inverse oferă un sprijin suplimentar pentru mecanismul propus.

IV.2. Specificitatea de substrat a DNA-ligazelor

Din prezentarea mecanismului reacției ligazice (fig. 21) a reieșit că pentru desfășurarea ei este necesară prezența unei crestături cu capete 3'-hidroxil și 5'-fosfat pe una din catenele duplexului de DNA, fără ca în urma schimbării să fie îndepărtat vreun nucleotid, deci capetele trebuie să rămînă adiacente. Fig. 26 rezumă cîteva din situațiile în care se poate găsi ligaza față de un DNA cu întreruperi într-unul din lanțurile polinucleotidice. Or, din cele cinci situații arătate, numai cazul V este singurul care îndeplinește cerințele necesare pentru ca ligaza să-și exercite acțiunea. Weiss și colab. (1968) au arătat că natura bazelor azotate care mărginesc crestătura nu are nici o importanță și că reacția ligazică este independentă de acest factor.

La începutul capitolului s-a arătat că DNA-ligaza din *E. coli* și cea indusă de bacteriofagul *T4* în celulele de *E. coli* infectate au cerințe diferite în ceea ce privește cofactorul participant la reacția ligazică în calitate de furnizor de energie și donor de grupări adenil. Dar deosebirile dintre cele două enzime nu se opresc aici: ele prezintă și specificitate de substrat diferită. S-a stabilit că *T4* DNA-ligaza — dar nu și *E. coli* DNA-ligaza — poate cataliza legarea nu numai a oligodeoxiribonucleotidelor, ci și a oligoribonucleotidelor în duplexurile hibride RNA-DNA (Fareed și colab., 1971; Kleppe și colab., 1970; Olivera și Lehman, 1968); de asemenea, tot numai DNA-ligaza *T4* are proprietatea de a

îndeplini legarea cap-la-cap *(end-to-end)* a două duplexuri de DNA cu capete netede, necoezive (capete cu perechi complete de baze; tocite = *blunt* sau *flush ends*) (Sgaramella și colab., 1970).

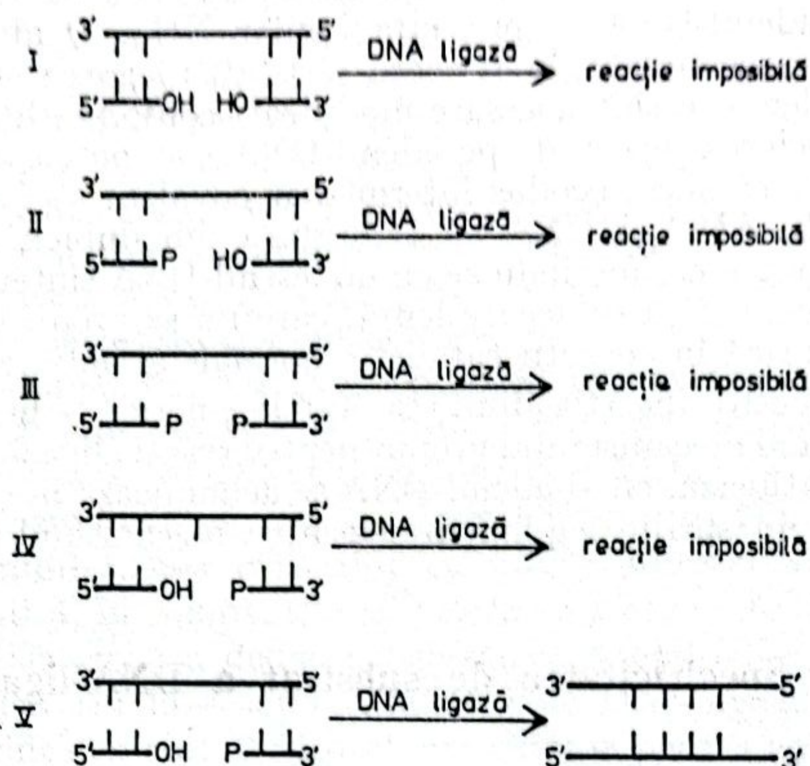


Fig. 26. Specificitatea de acțiune a DNA-ligazei pentru capetele 3'-hidroxil și 5'-fosfat adiacente.

Primele încercări de legare cu DNA-ligaza *T*4 făcute pe fragmente cu capete „tocite" de DNA dublu catenar, s-au soldat cu randamente extrem de scăzute, deoarece era necesar ca porțiunile terminale ale celor două capete ce urmau a fi legate să fie neapărat adiacente, ceea ce în soluție, spontan, se petrece cu o probabilitate foarte mică.

Pe de altă parte, lucrări recente ale lui Sgaramella și colab. (1977) și Sgaramella și Ehrlich (1978) au arătat că randamentul de circularizare a unor fragmente de DNA cu capete tocite (obținute în urma hidrolizei cu diverse enzime de restricție), prin acțiunea *T*4 ligazei, variază în limite foarte largi (tabelul 7). Autorii presupun că dispersia rezultatelor s-ar putea datora lungimii diferite a segmentelor de DNA. Rezultatele arată că fragmentele mici se circularizează cu randament mai mare decît fragmentele lungi. Aceasta înseamnă că probabilitatea așezării capetelor în poziție adiacentă convenabilă acțiunii ligazei este mai mare la fragmentele mici.

În general însă, în cazul legării unor capete netede, pentru realizarea unei legături eficiente, cu randament crescut, era necesară găsirea soluției tehnice de aducere a capetelor celor două fragmente la o distanță convenabilă ca ligaza să poată acționa.

Tabelul 7

Circularizarea segmentelor de DNA cu capete netede, produse de enzimele de restricție, determinată de T4 ligază (după Sgaramella și Ehrlich, 1978)

Enzima de restricție	DNA	Secvențe de rupere	Nr. situsurilor de rupere	Lungimea medie a segmentelor DNA (nucleotide)	Circularizare (%)
Hpa I	*pSC101*	d(G—T—T·A—	1	9 000	5
	pMB9	—A—C)	1	7 000	5
Sma I	*pSC101*	d(C—C—C—G—	1	9 000	20
	pMB9	—G—G)	1	6 000	20
Hin*d* II	*SPB*	d(G—T—Y—R— —A—C)	10	4 000	25
Bsu I	*pSC101*	d(G—G—C—C)	≈ 10	≈ 900	75
	pMB9		≈ 60	≈ 800	75

Independent unul de celălalt, două colective de cercetători (Jackson și colab., 1972; Lobban și Kaiser, 1973) au pus la punct o metodă simplă și ingenioasă de realizare a acestui deziderat (fig. 27). S-a pornit de la DNA care are porțiuni monocatenare terminale, care se pot lega între ele prin împerecherea bazelor pe baza principiului complementarității lor. Structurile de DNA astfel formate se mențin datorită punților de hidrogen A-T și G-C stabilite, ceea ce facilitează intervenția ligazei. Practic, dacă se pornește de la un DNA *CCI*, prima etapă a reacției (fig. 27) constă în transformarea lui în DNA liniar. Aceste molecule liniare sînt susceptibile la atacul cu exonuclează din bacteriofagul λ, care le taie capătul 5'-fosfat. Cu ajutorul transferazei terminale (fig. 27, *c*), la capătul 3'-hidroxil al catenelor de DNA se leagă nucleotide specifice complementare, de exemplu adenină în prezența dATP și timină în prezența dTTP, ca furnizori de energie și de nucleotide. Prin amestecarea celor două specii de DNA se creează punți de hidrogen între bazele complementare de la capetele lor, ceea ce duce la circularizarea moleculei nou formate. Pentru a umple golurile rămase între catene și a le aduce la faza de „crestătură cu capetele adiacente" se utilizează DNA polimerază, care „cîrpește" lipsurile din catenele simple. În ultima etapă (fig. 27, *e*) va interveni DNA-ligaza, care în acest fel contribuie la realizarea unui dimer corespunzător DNA de la care s-a pornit.

Vitezele reacțiilor de legare cap-la-cap sînt foarte mici, comparativ cu viteza de legare a crestăturilor monocatenare din duplexul de DNA, iar semnificația lor *in vivo* mai trebuie studiată.

În plus față de activitatea DNA ligazică *T*4, în extractele de *E. coli* infectată cu bacteriofag *T*4 s-a pus în evidență și o activitate RNA ligazică independentă, care reușește să transforme fragmente scurte (30—

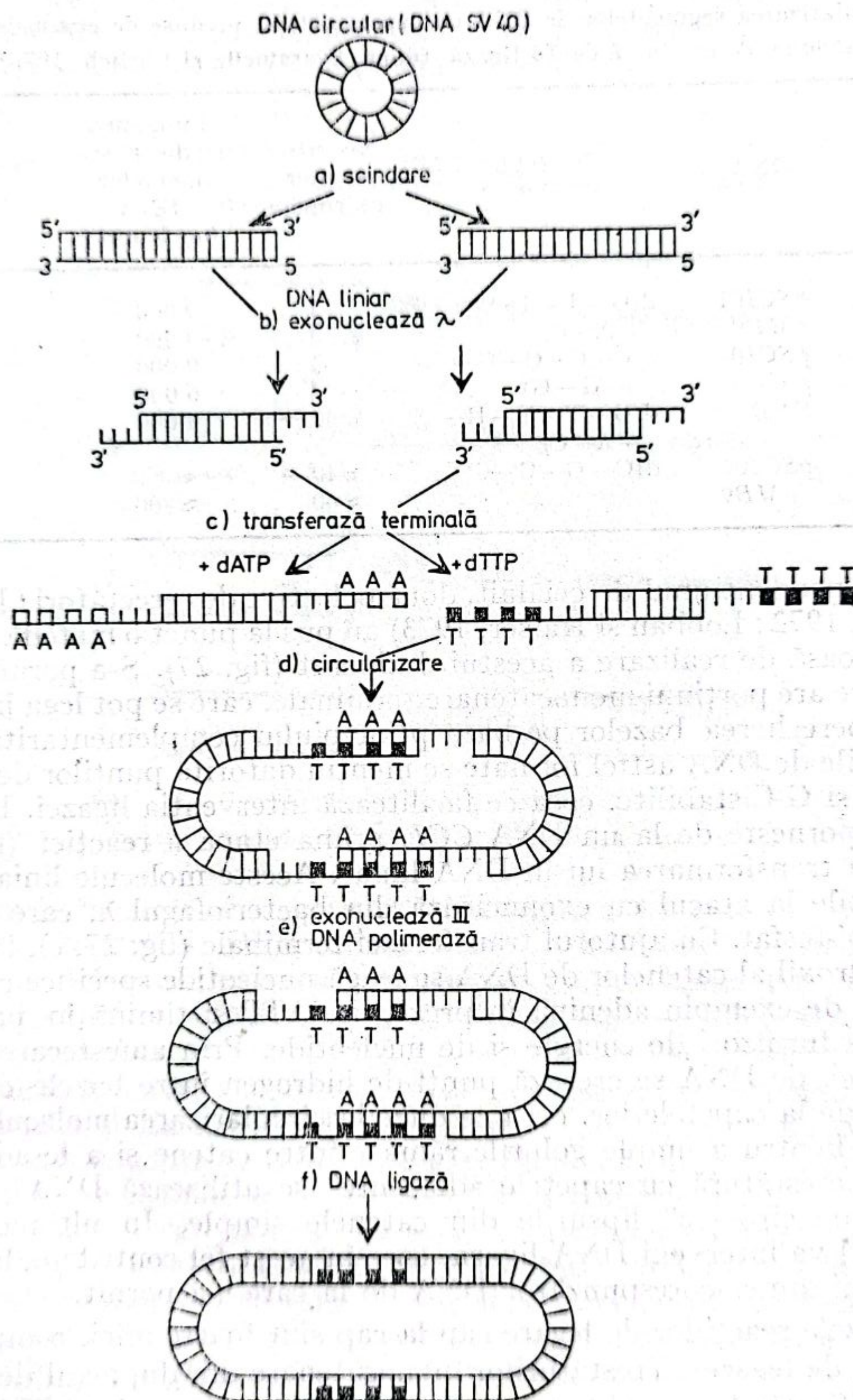


Fig. 27. Formarea unei molecule de DNA dimer cu ajutorul unor enzime printre care și DNA-ligaza (după *Jackson* și colab., 1972).

40 nucleotide) de poliA sau poliI într-un produs cu conformaţie circulară, în cadrul unei reacţii ATP-dependente. În acest caz, nu este necesară existenţa unor structuri de tip duplex, care dealtfel s-au dovedit a fi chiar uşor inhibitorii pentru desfăşurarea activităţii RNA ligazice (Silber şi colab., 1972).

IV.3. Proprietăţile fizico-chimice ale DNA-ligazelor

IV.3.1. Masa moleculară

Analiza electroforetică a DNA-ligazei în gel de poliacrilamidă conţinînd DDS 0,1%, şi în condiţii reducătoare, precum şi nereducătoare, a permis să se stabilească omogenitatea de compoziţie a acestei enzime.

Electroforeza în condiţii reducătoare a arătat că masa moleculară relativă a ligazei din *E. coli* este de 74 000 ± 3 000 (Modrich şi Lehman, 1972) şi ceva mai mică, 65 000 ± 3 000 (Panet şi colab., 1973), pentru DNA-ligază *T4*. Cercetările au precizat că ambele enzime au molecula formată dintr-un singur lanţ polipeptidic, ceea ce a surprins întrucîtva, ţinînd cont de complexitatea reacţiei pe care o catalizează. Iniţial, pentru enzima din *E. coli*, s-au obţinut rezultate care pledau pentru o structură cu subunităţi, dar ulterior s-a precizat că era vorba de artefacte provocate în urma proteolizei enzimei în cursul unor lungi perioade de dializă (Modrich şi colab., 1973).

Examinarea enzimei prin ultracentrifugare analitică a arătat de asemenea, existenţa unei singure benzi, de unde s-a calculat că puritatea preparatelor obţinute depăşeşte 95% (Lehman, 1974).

Coeficientul de sedimentare a *E. coli* DNA-ligazei, determinat prin sedimentare analitică la 2,1 mg proteină/ml, s-a stabilit a fi $S_{20,w}$ = = 3,91 S, în concordanţă cu valoarea de 4,2 S găsită prin ultracentrifugare în gradient de sucroză. Se pare că valoarea 3,91 este mai mică decît cea care era de aşteptat pentru o proteină globulară cu masa de 74 000, datorită unei forme moleculare asimetrice a enzimei.

IV.3.2. Compoziţia în aminoacizi şi proprietăţile spectrale

Izolarea *E. coli* DNA-ligazei în stare de înaltă puritate şi în cantitate suficientă a permis stabilirea compoziţiei în aminoacizi a enzimei, care este redată în tabelul 8.

Tabelul 8

Proporția de aminoacizi/mol ligază (după Lehman, 1974)

Aminoacidul	moli/mol ligază	Aminoacidul	moli/mol ligază
Asp	56,2	Gly	51,3
Glu	87,9	Ala	66,5
Lys	32,4	Val	65,7
His	15,3	Leu	70,6
Arg	41,7	Ileu	28,1
Thr	35,5	Phe	26,1
Ser	30,4	Tyr	7,8
1/2 Cys	8,1	Try	7,4
Met	10,0	Pro	33,9

Se știe că absorbția la 280 nm a proteinelor se datorează aminoacizilor cu nucleu aromatic ce intră în compoziția lor. În cazul DNA-ligazei se constată un conținut relativ scăzut de tirozină (sub 2%), ceea ce ar putea explica spectrul în UV, ceva mai neobișnuit, al acestui polipeptid, precum și un raport $E_{280}/E_{260} = 1,42$, pentru forma neadenilată a enzimei. La o concentrație de 1 mg proteină/ml s-a determinat $E_{280} = 0,72$.

Incubarea *E. coli* DNA-ligazei cu NAD^+ marcat cu ^{32}P duce la formarea de adenilatligază, în care un mol de ^{32}P-AMP revine la 74 000 g enzimă, deci la o moleculă-gram. În urma legării AMP la enzimă se constată că lungimea de undă la care absorbția în UV a proteinei este maximă se schimbă de la 278 nm, pentru enzima liberă, la 268 nm, pentru enzima legată, ca urmare a influenței nucleului purinic ce se atașează la enzimă. Pornind de la presupunerea că nici enzima și nici AMP nu suferă modificări spectrale semnificative în urma formării complexului activat — pe de o parte — și de la scăderea raportului E_{280}/E_{260} de la 1,42 la 0,99 — pe de altă parte — s-a putut calcula stoechiometria reacției de adenilare, obținîndu-se proporția de 1 mol AMP: 1 mol proteină enzimatică.

IV.3.3. Cofactori și ioni

Se reamintește că *E. coli* DNA-ligaza prezintă specificitate pentru NAD^+, ca furnizor de energie în reacția de legare (Olivera și Lehman, 1967; Zimmerman și colab., 1967); ea este complet inactivă în prezența ATP. O serie de autori au arătat că NAD^+ poate fi înlocuit, în calitatea lui de cofactor, numai de către tionicotinamid-NAD^+ sau de un alt analog al NAD^+, și anume 3'-izoadenil-NAD^+. De asemenea, pentru a-și exercita acțiunea această ligază reclamă prezența ionilor de Mg^{2+}

(1—3 mM) (Olivera și Lehman, 1967; Zimmerman și colab., 1967) sau Mn^{2+} (0,2—1,0 mM) (Zimmerman și colab., 1967).

Concentrația optimă de ioni Mg^{2+} este de 10 mM; la 3 și la 30 mM Mg^{2+} se constată 35% și, respectiv 80% din activitatea maximă. Ionii de Mn^{2+} îi pot înlocui pe cei de Mg^{2+} numai parțial. Concentrația optimă de Mn^{2+} 10 mM restabilește doar 25% din activitatea manifestată în prezența unei concentrații identice de ioni Mg^{2+}. Exprimarea activității DNA-ligazei *T*4 necesită și prezența ditiotreitolului, omiterea lui reducînd activitatea enzimatică cu 75%. Înlocuirea ditiotreitolului cu β-mercaptoetanol duce la o scădere cu 60% a activității acestei enzime (Weiss, 1971). Încă nu este complet elucidat rolul Ca^{2+} în cursul reacției și există controverse asupra acestui punct (Olivera și Lehman, 1967; Zimmerman și colab., 1967).

IV.3.4. *p*H optim și stabilitate

În tampon Tris 66 mM-HCl, *p*H-ul optim de desfășurare a reacției ligazice este de 7,2—7,8. La *p*H 6,9 enzima mai prezintă doar 46%, iar la *p*H 8,0 doar 65% din activitatea la *p*H 7,6 (Weiss, 1971).

Enzima purificată este activă într-un domeniu de *p*H relativ larg (6,5—9,5). Activitatea de legare a DNA scade rapid în medii cu tărie ionică scăzută (< 40 mM). Fracțiunile de enzimă purificată se inactivează lent chiar în medii cu tărie ionică moderată (0,1 M) și chiar dacă sînt păstrate în glicerol la —5°C, fenomen căruia Zimmerman și Oshinsky (1969) i-au dat următoarea explicație: enzima ar putea exista în trei forme (una complet activă *I*, a doua cu afinitate mai scăzută pentru substratul de DNA *II* și o a treia lipsită de activitate *III*). Inactivarea s-ar datora în principal trecerii formei *I* în *II* și apoi în *III*. Adăugarea de serumalbumină bovină (concentrație finală 0,1%) la soluțiile de DNA-ligază previne inactivarea în medii de tărie ionică moderată. Încălzirea enzimei timp de 5 minute la 60°C provoacă inactivarea ei totală.

Spre deosebire de *E. coli* DNA-ligaza, enzima de legare izolată din *E. coli* infectată cu bacteriofagul *T*4 s-a dovedit mai stabilă: după o păstrare de cca 6 luni la 0°C se înregistrează o pierdere de aproximativ 50% din activitate, dar dacă probelor enzimatice li se adaugă 50% glicerol se pot păstra pînă la șase luni, la —15°C, fără o pierdere semnificativă a activității (< 10%) (Weiss, 1971).

IV.3.5. Temperatura optimă

Viteza reacției enzimatice este mult influențată de temperatură: la 0°C, 10°C și 20°C se observă doar 10, 20 și, respectiv 55% din viteza la 37°C; la 45°C se regăsește doar 20% din activitatea la 37°C și se observă inactivarea ireversibilă a enzimei.

IV.4. Izolarea și purificarea DNA-ligazelor

Pentru izolarea și purificarea ligazelor au fost puse la punct mai multe metode, în general greoaie și laborioase, comportînd un număr variabil de etape, dintre care nu lipsesc însă precipitarea cu sulfat de amoniu, pentru îndepărtarea excesului de proteine celulare, și cromatografia pe coloană de DEAE-celuloză în gradient de săruri, care are drept scop separarea ligazelor de enzimele cu acțiune exonucleazică, ce eluează la alte concentrații saline, mai mici.

În cazul *E. coli* DNA-ligazei, Olivera (1971) dă următoarea schemă de izolare și purificare (tabelul 9):

Tabelul 9

Purificarea *E. coli* DNA-ligazei (după Olivera, 1971)

Fracțiunea	Volumul total (ml)	Activitatea totală (unit.)	Activitatea specifică (unit./mg proteină)
I. Extract celular bacterian	172	8 680	2,4
II. Precipitare cu streptomicină	735	(3 620)*	(2,6)*
III. Precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$	52	5 040	8,1
IV. Cromatografie pe DEAE-celuloză	38	2 800	75
V. Cromatografie pe fosfoceluloză	35	1 022	1575 (12% din activitatea inițială)

* Streptomicina reziduală inhibă reacția de testare a activității ligazice, dînd rezultate false în această etapă.

Metoda propusă a permis o purificare de 650 ori a enzimei.

Spargerea celulelor pentru obținerea extractului se realizează prin ultrasonicare. Resturile celulare se îndepărtează prin centrifugare, iar la supernatant se adaugă streptomicină, pentru îndepărtarea acizilor nucleici înalt polimerizați. Se centrifughează, iar noul supernatant care rezultă se tratează imediat cu sulfat de amoniu; se obține astfel fracțiunea III, care în continuare, se supune cromatografiei pe coloană de DEAE-celuloză. Eluția se face în gradient de săruri. Fracțiunea enzimatică activă suferă o nouă cromatografie, pe fosfoceluloză. Noile fracțiuni în care eluează enzima se unifică și se concentrează prin dializă contra sucroză solidă. În acest mod se recuperează cca 75% din activitatea enzimei cuprinsă în fracțiunea V.

În extractele celulare enzima poate exista sub formă liberă sau legată ca adenilatligază. Cromatografia pe fosfoceluloză este ineficace dacă enzima este legată, deoarece această formă nu se adsoarbe bine

pe fosfoceluloză; de aceea se recomandă ca tampoanele de lucru să conțină EDTA, care determină ca enzima să existe în special sub formă liberă.

Un procedeu analog de purificare, cu mici diferențe, au folosit Weiss și colab. (1968) și Weiss (1971) în cazul DNA-ligazei *T*4 (tabelul 10):

Tabelul 10

Purificarea DNA ligazei T4 (după Weiss și colab., 1968)

Etapa	Activitate totală (unit. × 10^{-2})	Activitate specifică (unit./mg prot.)	Proteină (mg/ml)	Randament (%)
I. Extract celular bacterian	153	11,6	11,4	100
II. Precipitare cu streptomicină	98	2,0	5,0	64
III. Precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$	48	2,8	15,2	31
IV. Cromatografie pe DEAE-celuloză I	38	3,6	3,5	25
V. Cromatografie pe DEAE-celuloză II	16 (24)	14 (21)	0,15	10
VI. Cromatografie pe fosfoceluloză	9 (14)	—	0,01	6
VII. Concentrare	8 (12)	1700(2500)	0,08	5

Fracțiunea VII — eluatul de pe fosfoceluloză, concentrat — a fost purificată de cca 1000 ori față de produsul inițial.

Recent, Moore și James (1976) au simplificat metoda propusă în 1968 de Weiss și colab. (1968), ceea ce a ușurat și urmărirea activității enzimatice pe parcursul procesului de purificare. Ei au folosit schema din tabelul 11:

Tabelul 11

Purificarea DNA-ligazei T4 (după Moore și James, 1976)

Fracțiune	Volum (ml)	Proteina (mg/ml)	Proteina totală (mg)	Activitate (unit. × 10^{-6})
I. Extract celular total (Precipitare cu streptomicină)	400	26,5	10600	—
II. Precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$	100	4,6	460	—
III. Eluat de pe fosfoceluloză	255	0,15	38	3,6
IV. Eluat de pe DEAE-celuloză	250	0,045	11,3	1,9
V. Concentrat cu glicerol	68	0,16	10,9	1,7

De reținut inversarea ordinei în care se face cromatografia pe fosfoceluloză: în procedeul propus de Weiss și colab. (1968) aceasta urma separării pe DEAE-celuloză; de asemenea, s-a renunțat la una dintre cele două separări pe DEAE-celuloză (compară cu tabelul 10).

Folosind tehnologia DNA recombinant, Panasenko și colab. (1977) au construit un hibrid de *E. coli* și bacteriofag λ, hibrid care conține gena *E. coli* DNA-ligazei. În acest caz, bacteriofagul λ a fost folosit ca vehicul pentru amplificarea genei; s-a reușit o creștere de cca 500 ori a activității ligazei în acest lizogen stabil. În extractele celulare bacteriene infectate cu acest recombinant, ligaza ajunge să reprezinte cca 5% din proteinele celulare, ceea ce ușurează considerabil procesul de purificare a enzimei, pentru care Panasenko și colab. (1978) propun următoarea schemă (tabelul 12):

Tabelul 12

Purificarea DNA-ligazei din recombinantul *E. coli* 594 *gt4 lop* 11 *lig*$^{+}$*S7* (Panasenko și colab., 1978)

Etapa	Proteină (mg/ml)	Activitate totală (unit. × 10^{-5})	Activitate specifică (unit./mg prot.)	Randament %
I. Extract celular	21	4,7	75	(100)
II. Precipitare cu Polymin P	—	5,4	—	112
III. Precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$	11,8	4,4	375	94
IV. Cromatografie pe fosfoceluloză	0,015	2,0	6000	43
Concentrarea fracțiunii IV	7,0	2,1	6300	44

Metoda permite obținerea unei enzime cu o puritate mai mare de 95%, sub forma unui pic foarte strîns la cromatografia pe fosfoceluloză (fig. 28).

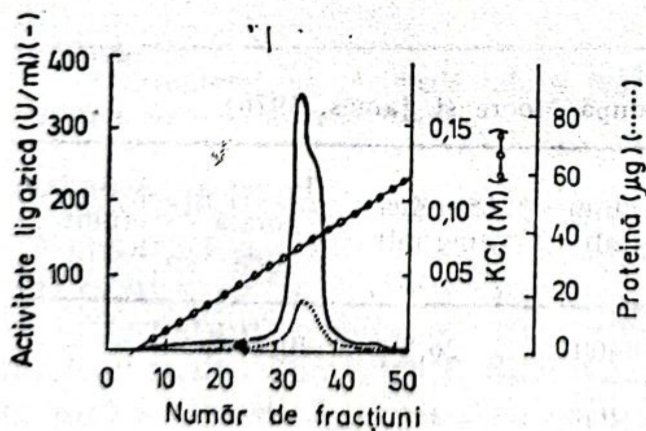


Fig. 28. Cromatografia pe fosfoceluloză a fracțiunii a III-a, cu obținere de DNA-ligază pură (după *Panasenko* și colab., 1978).

IV.5. Testarea activității DNA-ligazice

Activitatea DNA-ligazelor se exprimă în unități. Pentru unitatea de DNA-ligază *T4*, Weiss și colab. (1968) dau următoarea definiție: unitatea este acea cantitate de ligază care catalizează în 20 minute

conversia unui picomol * de ^{32}P-fosfomonoesteri într-o formă rezistentă la acțiunea fosfatazei alcaline, iar Kleppe și colab. (1970) aduc unele mici modificări de enunț: unitatea este acea cantitate de enzimă care catalizează transformarea într-un minut a unui pM de capete ^{32}P-5'-fosfat din dT_{10} la o formă nesusceptibilă la acțiunea fosfatazei alcaline bacteriene, în condiții standard (Gupta și colab., 1968).

Pentru testarea activității ligazice s-au descris patru clase majore de reacții și anume:

A. formarea adenilatligazei, intermediar acidoinsolubil, prin reacția dintre enzima liberă și NAD^+ marcat la restul de adenină (Zimmerman și Oshinsky, 1969);

B. conversia unui DNA liniar la o formă circulară și detectarea lui fie prin: a) proprietăți de sedimentare alterate (Gefter și colab., 1967; Gellert, 1967), fie prin b) absența susceptibilității la acțiunea exonucleazelor (Modrich și Lehman, 1970; Olivera și colab., 1968) sau prin alte metode;

C. conversia unui DNA denaturat la o formă renaturabilă și detectarea DNA nativ prin adsorbția sa selectivă pe hidroxiapatită (Zimmerman și colab., 1967);

D. conversia capetelor 5'-fosfomonoesterice ale catenelor de DNA la diesterfosfați, nesusceptibili la acțiunea fosfatazei alcaline de origine bacteriană (Olivera și Lehman, 1967a; Weiss și Richardson, 1967).

Toate aceste metode sînt general valabile pentru testarea oricărei activități ligazice, cu excepția primei grupe de reacții (A), care nu se poate aplica decît acelor DNA-ligaze care — pentru a-și desfășura acțiunea — au nevoie de prezența NAD^+ drept cofactor.

Metoda A. folosește cel mai simplu substrat; totuși nu se poate folosi decît după ce probele au fost dializate, pentru îndepărtarea NAD^+ endogen. Metodele B. și C. folosesc drept substrat DNA de bacteriofag λ (sau oricare DNA bacteriofagic cu o structură similară). Dacă se urmărește testarea unui număr mare de probe — cazul procesului de izolare și purificare a enzimei — metodele acestea se dovedesc greoaie. În plus, metoda B. a) este deosebit de sensibilă la prezența endonucleazelor care ar putea impurifica preparatele de ligază. Metodele B. a) și D. sînt convenabile pentru a fi folosite cînd este nevoie să se facă screening-ul unui număr mare de probe. Există și aici un inconvenient și anume exonucleaza cu care se lucrează (metoda B. b)) trebuie să fie lipsită de activitate endonucleazică. Pentru a da rezultate bune, metoda D. necesită un γ-^{32}P-ATP cu o activitate specifică ridicată, precum și o polinucleotidkinază cu un înalt grad de puritate.

În continuare se vor analiza pe rînd cîteva din grupele de metode de interes general, cu aplicabilitate pentru toate tipurile de ligază, deci grupele B., C., D.

---

* 1 picomol (pM) = 10^{-12} moli

IV.5.1. Conversia DNA liniar la forma CCI

Această conversie se poate pune în evidență prin diverse mijloace.

IV.5.1.1. **Ultracentrifugare.** Ca urmare a acțiunii ligazice asupra formelor liniare de DNA (de natură bacteriofagică, de exemplu λ sau *T7*) apar forme *CCI* DNA, cu proprietăți de sedimentare în gradient de densitate deosebite și anume: formele *CCI* prezintă o densitate mai mare decît cele liniare. DNA bacteriofagici amintiți mai sus au la capetele structurii lor bicatenare regiuni monocatenare complementare; acestea pot interacționa fie intracatenar, cu formare de molecule circulare, legate prin punți de hidrogen, fie intercatenar și atunci apar dimeri sau alți oligomeri, formați tot prin punți de hidrogen. Atît monomerii, cît și oligomerii circulari prezintă în molecula lor dublu catenară unele crestături *(nicks)* monocatenare, care constituie locul de acțiune al DNA-ligazelor.

Moleculele *CCI* se detectează după formare prin rapida lor sedimentare (de 3,6—4 ori) în gradient de sucroză în mediu alcalin, față de moleculele liniare.

Lucrînd cu DNA din bacteriofagul *T7* ca substrat pentru testarea activității DNA-ligazei *T4*, Weiss și Richardson (1967) au obținut următoarele rezultate (fig. 29):

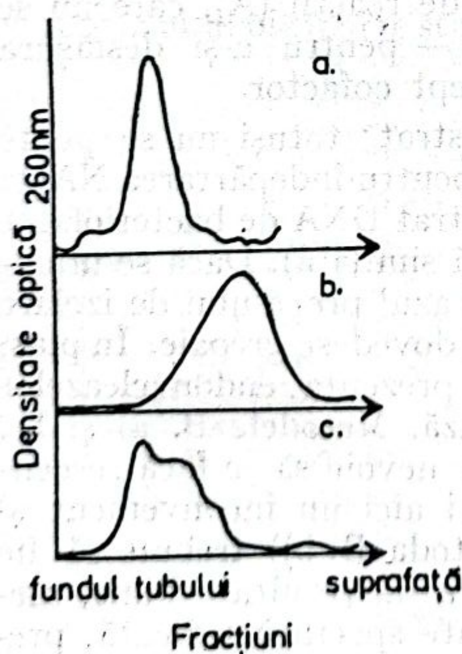


Fig. 29. Ultracentrifugarea analitică în gradient de sucroză și în mediu alcalin a produșilor reacției ligazice: a) DNA *T7* martor; b) DNA *T7* cu crestături realizate prin tratament cu DNază pancreatică, incubat cu ligază în absența ATP; c) DNA *T7* cu crestături (vezi mai sus) incubat cu ligază în prezența ATP. Preparatele de DNA s-au denaturat anterior ultracentrifugării (după *Weiss* și *Richardson*, 1976).

Se observă că DNA *T7* intact (fig. 29, *a*) are o densitate mai mare decît cel cu crestături într-una din catene (fig. 29, *b*), mergînd spre partea de jos a tubului. Prin acțiunea DNA-ligazei *T4* o parte din materialul lezat se repară, el comportîndu-se la ultracentrifugare asemănător cu martorul (fig. 29, *c*).

IV.5.1.2. **Electroforeză.** Metoda folosește ca substrat pentru acțiunea ligazei DNA de bacteriofag λ, care a fost anterior supus hidrolizei cu endonucleaza de restricție Eco *R*I, rezultînd șase fragmente cu următoarele mase moleculare: 12×10^6 D (1), 4×10^6 D (2), $3,3 \times 10^6$ D (două fragmente identice) (3, 4), $2,7 \times 10^6$D (5), $2,1 \times 10^6$D (6). În momentul în care ligaza testată este pusă în contact cu aceste fragmente de DNA se constată dispariția de pe electroforegramă a benzii cu masa de $2,1 \times 10^6$D; are loc conversia benzilor 1 și 6, care se leagă inițial prin punți de hidrogen, la o formă *CCI*, nedenaturabilă termic (fig. 30). Punerea în evidență a fragmentelor de DNA se face în UV, prin colorare cu bromură de etidiu.

IV.5.1.3. **Microscopie electronică.** Colorații specifice pot pune în evidență acizii nucleici. Pe preparate se pot deosebi formele *CCI* de cele

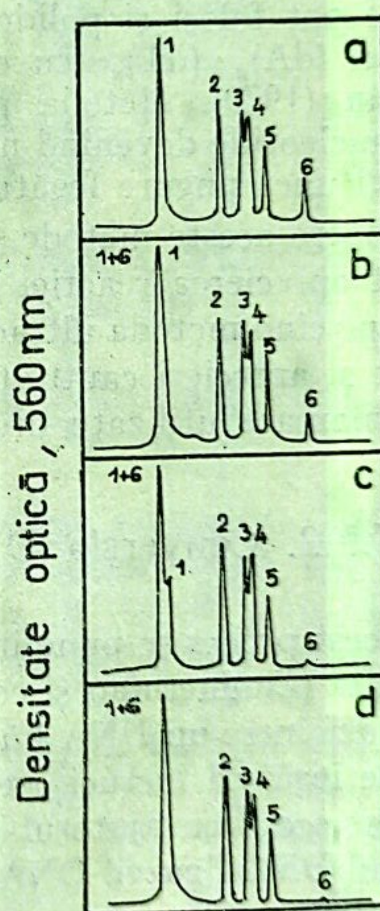


Fig. 30. Densitograma produșilor reacției ligazice, separați electroforetic. S-a înregistrat intensitatea fluorescenței benzilor de DNA colorat cu bromură de etidiu. Cantitatea de enzimă folosită a variat, crescînd de la a) (o unitate) la d)(2 unități) (după *Moore* și *James*, 1976).

liniare. Moleculele rezultate prin circularizare intracatenară cu punți de hidrogen se aduc anterior colorării la conformația de DNA liniar. Metoda a fost pusă la punct de Sgaramella în 1972.

IV.5.1.4. **Ultrafiltrare.** Filtrele nitrocelulozice reușesc să facă discriminarea între diverse conformații ale DNA: liniar, circular cu punți de hidrogen — pe de o parte — și circular deschis (*CD*) și circular covalent

închis (*CCI*) — pe de altă parte. Primele forme enumerate trec prin filtre, în timp ce celelalte două sînt reținute. Drept substrat se utilizează, și în acest caz, ^{3}H- sau ^{32}P-DNA λ sau analog, după cum au preconizat Reiser și colab. (1976). Substratul, adus la forma sa liniară, se incubează cu probele de ligază, iar apoi reacția se stopează cu un detergent, de exemplu DDS. „Cercurile Hershey" (formate prin punți de hidrogen) sînt aduse la forma liniară. Se face apoi filtrarea. Formele *CD* și *CCI* rămîn pe filtru și se poate măsura radioactivitatea reținută, din care se apreciază gradul de legare.

IV.5.1.5. **Enzimatic, cu exonuclează.** Moleculele de tip *CCI*, formate prin legarea capetelor 3'-hidroxil și 5'-fosfat cu apariția legăturilor fosfodiesterice, devin insensibile la acțiunea exonucleazei III, după cum au constatat Olivera și Lehman (1967 a). Ca substrat, în acest caz, se pot folosi și polideoxiribonucleotide sintetice, de tipul copolimerului $(dA)_n \cdot (dT)_n$ (cu cca 1000 nucleotide) propus de Modrich și Lehman (1970). Metoda prezintă o mare sensibilitate, aproximativ 1000 nucleotide devenind nesusceptibile la exonucleaza III ca urmare a sintezei unei singure legături fosfodiesterice.

Dintre aceste metode, metoda electroforezei și cea electronooptică permit aprecierea reacției ligazice mai ales din punct de vedere calitativ, pe cînd metoda ultracentrifugării, a ultrafiltrării și cea enzimatică permit și aprecieri cantitative asupra reacției ligazice, pe baza produselor marcate utilizate drept substrat.

IV.5.2. Conversia DNA denaturat la forme renaturabile

Acest proces se pune în evidență prin adsorbție selectivă pe hidroxiapatită (Zimmerman și colab., 1967). În esență el constă în formarea de dimeri între un DNA liniar marcat și un DNA de bacteriofag λ care conține legături încrucișate *(cross lincks)* intercatenare, induse special în acest scop, cu ajutorul unor agenți alchilanți. După legarea lor cu ajutorul DNA-ligazei, DNA se denaturează cu alcalii, care desfac toate legăturile în afara celor covalente. Apoi *p*H-ul se corectează la neutru, iar DNA se adsoarbe pe hidroxiapatită, în condiții în care se adsorb numai formele native, nu și cele denaturate. Spre deosebire de DNA normal, nativ, cel care conține în molecula sa legături încrucișate se renaturează imediat după readucerea probei la *p*H neutru. Împreună cu el rămîne și catena de DNA liniar atașată sub acțiunea DNA-ligazei, iar cealaltă catenă nu se adsoarbe. Măsurarea activității reținute pe coloana de hidroxiapatită permite evaluarea reacției ligazice, iar DNA cu legături încrucișate constituie un purtător pentru oricare

DNA marcat ce i s-a alipit ca urmare a activității ligazice. Schematic, procesul de legare a unui DNA de DNA cu legături încrucișate se poate rezuma ca în fig. 31 (Gellert, 1971).

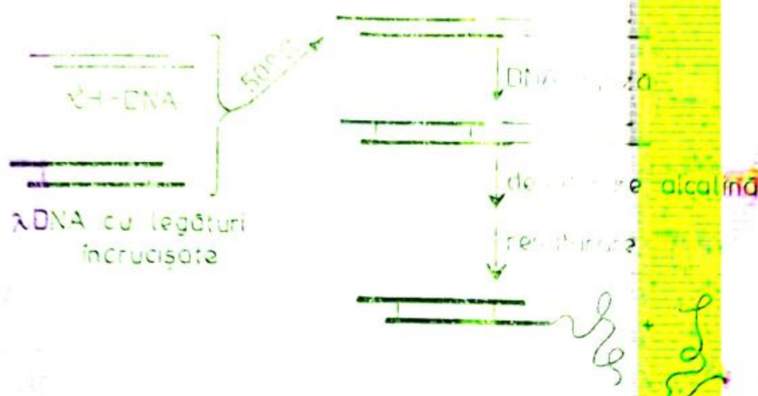


Fig. 31. Formarea dimerilor (și a unor agregate mai mari) prin legături de hidrogen între ^{3}H-DNA de bacteriofag λ și DNA λ cu legături încrucișate intramoleculare (după *Gellert*, 1971).

IV.5.3. Conversia capetelor 5′ $^{-32}$P-fosfomonoesterice ale catenelor de DNA la diesterfosfați

Ca urmare a acestei conversii rezultă o serie întreagă de efecte, printre care:

IV.5.3.1. **Pierderea susceptibilității la fosfataza alcalină de origine bacteriană.** O serie de autori ca Weiss și Richardson (1967), Olivera și Lehman (1967 a), Gefter și colab. (1967) au arătat că activitatea ligazică poate fi determinată și prin testul susceptibilității DNA la fosfataza alcalină.

Testul are la bază următorul principiu: fosfataza alcalină hidrolizează grupările fosfat situate la capetele 5′-fosfat ale DNA. Or, în situația în care grupările 5′-fosfat terminale au dispărut prin interacțiunea lor cu grupările terminale 3′-hidroxil (v. mecanismul de acțiune al ligazei), tocmai datorită acțiunii ligazei, susceptibilitatea DNA la fosfataza alcalină dispare (fig. 32).

În prima etapă, substratul marcat se scindează (fig. 32, *a*) cu ajutorul DN-azei I, obținîndu-se în molecula bicatenară crestături avînd capete 3′-hidroxil și 5′-fosfat adiacente (fig. 32, *b*). La rîndul lor, aceste molecule constituie substrat pentru exercitarea acțiunii ligazice. În prezența enzimei de legare se reformează molecula inițială, reparată (fig. 32, *c*), asupra căreia fosfataza alcalină nu poate acționa, întrucît nu are capete fosfat libere. Dimpotrivă, dacă fosfataza este pusă în contact cu componenta *b*) din fig. 32, ea își va exercita acțiunea de scindare a grupărilor fosforice. În acest caz însă, ligaza nu va mai putea



trifugarea în gradient de sucroză în mediu alcalin a arătat că 65% din lanțurile de poli(dT) ating un coeficient de sedimentare de cel puțin două ori mai mare decît poli(dT) reacționate, iar 5% din produsul de reacție sedimentează chiar de 20 de ori mai rapid decît substratul inițial (Weiss și Richardson, 1967).

IV.5.3.3. Scăderea numărului de capete 5′-fosfat ale substratului, apreciat prin calcularea diferenței între numărul lor la începutul reacției ligazice și numărul lor la terminarea reacției. Metoda a fost propusă de către Weiss și Richardson (1967) și a fost reluată de Sladkova (1976), care utilizează ca substrat tot DNA de bacteriofag *T7*, dar care calculează de fapt numărul leziunilor reparate, cu capete 5′-fosfat incluse în legături fosfodiesterice și nu capetele 5′-fosfat rămase libere.

IV.5.3.4. Alte metode. În afara metodelor de testare a activității DNA ligazice (de reparare a leziunilor cu capete 3′-hidroxil și 5′-fosfat adiacente dintr-o singură catenă a DNA bicatenar) prezentate, în literatura de specialitate se mai întîlnesc numeroase altele, cum ar fi:

— legarea unei catene polinucleotidice la o altă catenă polinucleotidică imobilizată pe o matrice solidă, de exemplu prin esterificarea capătului ei 5′-fosfat cu o grupare hidroxil a unui rest de glucoză din celuloză (Spadari și colab., 1971);

— folosirea ca substrat a acidului polideoxicitidilic marcat cu ^{125}I; sensibilitatea crescută a metodei (de 1000 de ori mai mare) permite scăderea limitei de determinare a activității ligazice sub cea a metodelor curente (Spadari, 1972);

— reducerea numărului situsurilor accesibile unei DNA polimeraze (Karkas, 1974);

— restabilirea activității de transformare a DNA lezat (Ando și Kosawa, 1970; Laipis, 1969) etc.

Majoritatea metodelor sînt, în general, deosebit de laborioase și implică și folosirea altor enzime, cu un înalt grad de puritate, precum și a unor substraturi greu de preparat și care trebuie să aibă o activitate specifică a izotopului cu care sînt marcate suficient de ridicată. De aceea, dacă este nevoie doar de a se obține o dovadă calitativă a activității ligazice, cea mai accesibilă este metoda electroforetică: reacția de legare are loc în condiții standard pentru enzimă, iar produsul rezultat este analizat pe gel de agaroză și pus în evidență în UV, după colorare cu bromură de etidiu.

IV.5.4. Rolul *in vivo* al DNA-ligazelor

Majoritatea cunoștințelor asupra funcției *in vivo* a DNA-ligazelor se datorează studiului unor mutante bacteriene în care enzima este defectivă. Întrucît etapa de legare a unor fragmente de DNA este pre-

zentă în toate modelele de recombinare genetică, în repararea leziunilor moleculare la nivelul DNA, precum și în replicarea DNA, se poate presupune că lipsa ligazei din anumite bacterii va produce o serie de aberații în oricare din aceste procese, ceea ce va înlesni studierea rolu-

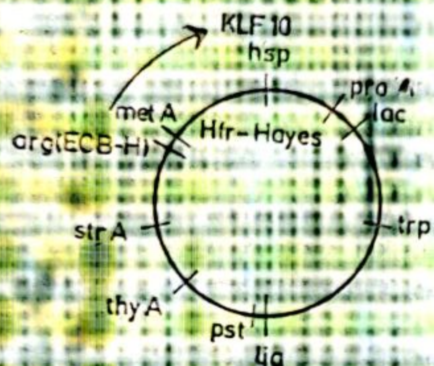


Fig. 33. Localizarea genei structurale pentru DNA-ligază pe harta genetică a *E. coli* (după *Taylor* și *Trotter*, 1967).

lui enzimei. S-au descris numeroși mutanți defectivi, atît în ceea ce privește *E. coli* DNA-ligaza, cît și DNA-ligaza *T4*.

Se cunosc două mutații ale genei structurale pentru ligază, iar ambele sînt situate pe harta genetică a *E. coli* la aproximativ 45 minute (Gottesman și colab., 1973; Taylor și Trotter, 1967) (fig. 33).

Deși extractele celulare ale ambilor mutanți conțin enzime anormale, termosensibile, numai unul dintre mutanți și anume *E. coli ligts7* (Gottesman și colab., 1973) este un mutant condițional letal, care nu supraviețuiește la 42°C, în timp ce mutantul celălalt *lig4* se comportă diferit. Ambii mutanți cultivă normal la 30°C. Diferența între comportările lor s-ar putea datora unei proporții diferite de activitate ligazică reziduală, care să persiste la temperatură ridicată.

Este interesant de văzut care sînt consecințele fiziologice ale acestor mutații. Mutantul *ligts7*, după cum s-a arătat mai sus, nu poate cultiva la 42°C și își pierde viabilitatea atunci cînd este trecut de la temperatura permisivă de 25°C la o temperatură nepermisivă (42°C). Același mutant s-a dovedit a fi deosebit de sensibil la agenții de alchilare, cum ar fi metilmetansulfonatul, sau la acțiunea razelor UV, chiar la temperatura permisivă. Bacteria care a suferit această mutație devine incapabilă să-și repare leziunile provocate la nivelul DNA de către agenții alchilanți mutageni.

Tulpina *ligts7*, după cum se poate presupune, prezintă defecte și la nivelul replicării DNA; lipsa ligazei duce la acumulări mari de fragmente Okazaki (Okazaki și colab., 1968), cu mult peste cele găsite la tulpina sălbatică. Întreaga cantitate de ^{3}H-timidină care se încorporează de către *E. coli ligts7* în cursul unei marcări de scurtă durată (10 secunde) la 42°C se regăsește într-o fracțiune de DNA cu coeficientul de sedimentare 10S. În condiții de creștere similare, tulpina *E. coli lig*$^{+}$ încorporează ^{3}H-timidina într-un DNA cu coeficient de sedimentare de 24S sau chiar puțin mai mare. Dacă marcarea de scurtă durată (în puls) a *E. coli ligts7* la 42°C este urmată de un tratament de 5 mi-

nute, la 25°C cu un exces de timidină nemarcată, cea mai mare parte a timidinei tritiate încorporate apare într-un DNA cu un coeficient mediu de sedimentare de 30S, ceea ce sugerează că materialul de 10S care se acumulează în mutant la temperatura nepermisivă este un precursor al DNA înalt polimerizat.

Întrucît existența unei DNA-ligaze funcționale este esențială pentru replicarea normală a DNA, precum și pentru repararea unor leziuni care pot apare la nivelul DNA, se pune întrebarea cum se poate explica creșterea normală, cît și viabilitatea mutantului *lig4* la temperaturi la care în extractele brute se găsește doar 1%, sau sub această valoare, activitate ligazică? S-ar putea ca ligaza să fie prezentă în celulă într-o cantitate mult mai mare decît cea de care celula are nevoie în mod normal.

Pe baza masei moleculare de 74 000 a enzimei *E. coli* DNA-ligază s-a făcut estimarea numărului de molecule de DNA ligază per celulă bacteriană, comparîndu-se activitatea enzimei pure cu activitatea determinată în extractele bacteriene brute. S-a constatat astfel că celulele de *E. coli* tulpină sălbatică crescute pe medii îmbogățite, ajung să conțină 200—400 replici de enzimă per celulă, număr apropiat de cel calculat pentru DNA-polimeraza I (Richardson și colab., 1964). Întrucît, la fel ca și DNA-polimeraza, DNA-ligaza acționează în ultima etapă a multiplicării DNA (Okazaki și colab., 1972), s-ar putea ca această asemănare frapantă între concentrațiile celor două enzime să nu fie întîmplătoare, ci să aibă o anumită semnificație legată de replicarea DNA.

Așa după cum s-a arătat anterior, o celulă de *E. coli* conține aproximativ 300 molecule de DNA-ligază (Modrich și colab., 1973). Întrucît turnover-ul enzimei este de 25 min^{-1} la 30°C (Modrich și Lehman, 1973), rezultă că în fiecare minut, într-o celulă pot fi reparate pînă la 7500 de crestături monocatenare ale moleculei de DNA. Deoarece ambele catene ale DNA cromozomal se replică în mod discontinuu (Gottesman și colab., 1973), iar DNA cromozomal de *E. coli* — la 30°C — se replică în aproximativ 65 minute (Bird și Lark, 1970), ținînd cont că lungimea medie a unui fragment Okazaki este de aproximativ 1000 nucleotide (Okazaki și colab., 1972), ar fi de ajuns ca într-o celulă, per minut, să aibă loc 200 de legări pentru ca multiplicarea celulelor să se poată produce.

Bibliografie

1. Ando, T., Kosawa, T., *Biochim. Biophys. Acta* **204**, 257 (1970).
2. Bird, R.E., Lark, K.G., *J. Mol. Biol.* **49**, 343 (1970).
3. Bode, V.C., Kaiser, A.D., *J. Mol. Biol.* **14**, 148 (1965).
4. Cozzarelli, N.R., Melechen, N.E., Jovin, T.M., Kornberg, A., *Biophys. Biochem. Res. Commun.* **28**, 578 (1967).
5. Fareed, G.C., Wilt, E.M., Richardson, C.C., *J. Biol. Chem.* **246**, 925 (1971).
6. Gefter, M.L., Becker, A., Hurwitz, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **58**, 240 (1967).

7. Gellert, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **57**, 148 (1967).
8. Gellert, M., in „*Methods in enzymology*", ed. L. Grossman & K. Moldave, Acad. Press (New York), vol. XXI D, p. 326 (1971).
9. Gottesman, M.M., Hicks, M., Gellert, M., *J. Mol. Biol.* **77**, 531 (1973).
10. Gumport, R.L., Lehman, I.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **68**, 2559 (1971).
11. Gupta, N.N., Ohtsuka, E., Weber, H., Chang, S.H., Khorana, G.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **60**, 285 (1968).
12. Hall, Z.W., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.* **244**, 43 (1969).
13. Harvey, C.L., Gabriel, T.F., Wilt, E.M., Richardson, C.C., *J. Biol. Chem.* **246**, 4523 (1971).
14. Howell, S.H., Stern, H., *J. Mol. Biol.* **55**, 357 (1971).
15. Jackson, D.A., Symonds, R., Berg, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **69**, 2904 (1972).
16. Karkas, J.D., *Biochim. Biophys. Acta* **340**, 452 (1974).
17. Kellenberg, G.M., Zichichi, M.L., Weigle, J.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **47**, 869 (1961).
18. Kleppe, K., van de Sande, J.H., Khorana, G.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **67**, 68 (1970).
19. Laipis, P.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **62**, 269 (1969).
20. Lehman, I.R., *Science* **186**, 790 (1974).
21. Lehman, I.R., in „*The enzymes*", ed. P. Boyer, Acad. Press (New York), vol. X, p. 237 (1974).
22. Lindhal, T., in „*Methods in enzymology*", ed. L. Grossman & K. Moldave, Acad. Press (New York), vol. XXI D, p. 333 (1971).
23. Lindhal, T., Edelman, G.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **61**, 680 (1968).
24. Lobban, P., Kaiser, A.D., *J. Mol. Biol.*, **78**, 453 (1973).
25. London, J., Knight, M., *J. Gen. Microbiol.*, **44**, 241 (1966)
26. Meselson, M., Weigle, J.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **47**, 857 (1961).
27. Mizutani, S., Temin, H., Nasahiko K., Robert W., *Nature New Biol.*, **230**, 232 (1971).
28. Modrich, P., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.*, **245**, 3626 (1970).
29. Modrich, P., Lehman, I.R., *Fed. Proc.*, **31**, 441 (1972).
30. Modrich, P., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.*, **248**, 7502 (1973).
31. Modrich, P., Anraku, P., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.*, **248**, 7495 (1973).
32. Modrich, P., Lehman, I.R., Wang, J.C., *J. Biol. Chem.*, **247**, 6370 (1972).
33. Moore, S.K., James, E., *Analyt. Biochem.*, **75**, 545 (1976).
34. Olivera, B.M., in „*Methods in enzymology*", ed. L. Grossman & K. Moldave, Acad. Press (New York), vol. XXI D, p. 311 (1971).
35. Olivera, B.M., Hall, Z.W., Lehman, I.R., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (U.S.A.), **61**, 237 (1968).
36. Olivera, B.M., Lehman, I.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **57**, 1462 (1967a).
37. Olivera, B.M., Lehman, I.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **57**, 1700 (1967b).
38. Olivera, B.M., Lehman, I.R., *J. Mol. Biol.*, **36**, 261 (1968).
39. Olivera, B.M., Scheffer, D., Lehman, I.R., *J. Mol. Biol.*, **36**, 275 (1968).
40. Okazaki, R., Arisawa, M., Sugino, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **69**, 2954 (1972).
41. Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K., Sugino, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **59**, 598 (1968).
42. Panasenko, S.M., Alazard, R.D., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.*, **253**, 4590 (1978).
43. Panasenko, S.M., Cameron, J.R., Davies, R.W., Lehman, I.R., *Science*, **196**, 188 (1977).
44. Panet, A., van de Sande, J.H., Loewen, P.C., Khorana, G.H., Raae A.J., Lillehaug J.R., Kleppe K.: *Biochemistry*, **12**, 5045 (1973).
45. Reiser, J., Bentley, C.M., Yuan, R., *Analyt. Biochem.*, **75**, **555** (1976).
46. Richardson, C.C., Schildkraut, C.L., Aposhian H.V., Kornberg A., *J. Biol. Chem.*, **239**, 222 (1964).
47. Sgaramella, V., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **69**, 3389 (1972).

48. Sgaramella, V., Bursztyn-Pettergrew, H., Ehrlich, D.S., în *„Recombinant molecules: impact on science and society"*, 10-th Miles Internat. Symp., ed. R.F. Beers & E.G. Basset, Raven Press (New York), p. 57 (1977).
49. Sgaramella, V., Ehrlich, S.D., *Eur. J. Biochem.*, **86**, 531 (1978).
50. Sgaramella, V., van de Sande, J.H., Khorana, G.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **67**, 1468 (1970).
51. Silber, R., Malathi, V.G., Hurwitz, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **69**, 3009 (1972).
52. Sladkova, N.I., *Bioorg. Himiia*, **2**, 822 (1976).
53. Spadari, S., *Analyt. Biochem.*, **63**, 380 (1972).
54. Spadari, S., Ciarrochi, G., Falaschi, A., *Eur. J. Biochem.*, **22**, 1. (1971).
55. Taylor, A.L., Trotter, C.D., *Bacteriol. Rev.*, **31**, 332 (1967).
56. Tsukada, K., Ichimura, M., *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **42**, 1156 (1971).
57. Young, E.T., Sinsheimer, R.L., *J. Mol. Biol.*, **10**, 562 (1964).
58. Wang, J.C., *J. Mol. Biol.*, **55**, 523 (1971).
59. Weiss, B., în *„Methods in enzymology"*, ed. L. Grossman & K. Moldave, Acad. Press (New York), vol. XXI D, p. 319 (1971).
60. Weiss B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C., Richardson, C.C., *J. Biol. Chem.*, **243**, 4543 (1968).
61. Weiss, B., Richardson, C.C., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **57**, 1021 (1967).
62. Weiss, B., Thompson, A., Richardson, C.C., *J. Biol. Chem.*, **243**, 4556 (1968).
63. Zimmerman, S.B., Little, J.W., Oshinsky C.K., Gellert, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **57**, 1841 (1967).
64. Zimmerman, S.B., Oshinsky, C.K., *J. Biol. Chem.*, **244**, 4689 (1969).

V. Vehicule (vectori)

Așa cum s-a arătat un *vehicul* sau un *vector* este o moleculă de DNA care are proprietatea de a se replica independent de cromozomul celular, proprietate pe care și-o păstrează și atunci cînd în molecula sa se introduce în mod artificial un fragment de DNA străin (v. cap. „Pasagerii"), purtător al unei informații genetice noi. Este de notat că inserția fragmentului de DNA în vehicul trebuie astfel realizată încît funcțiile esențiale ale vehiculului, necesare replicării lui, să nu fie deranjate.

Pentru a se putea replica, un vehicul are nevoie de două elemente principale și anume: a) o regiune din molecula de DNA, echivalentă originii replicării DNA (notată prescurtat *ori*) care să fie recunoscută de către o proteină cu funcție de inițiator și b) să conțină gena pentru această proteină în aceeași moleculă (Boyer și colab., 1977). Aceiași autori definesc astfel caracteristicile principale ale unui vehicul ideal:

— să fie ușor de purificat și să existe în cantități suficiente pentru experimentare;

— să posede markeri genetici asociați moleculei lor, bine caracterizați, care să permită o ușoară selecționare a celulelor purtătoare a acestor vehicule;

— să posede un număr limitat de situsuri pentru enzimele de restricție, care să ofere posibilitatea scindării specifice a vehiculului, în scopul atașării de el a unor fragmente noi de DNA.

Odată ce un vehicul posedă cele două elemente principale arătate mai sus, el îndeplinește condițiile postulate de Jacob și colab. (1963) pentru un *replicon*, deci el se poate autoreplica. Funcția de vehicul sau de replicon o pot ocupa atît plasmidele bacteriene, cît și unele virusuri. În principiu, orice plasmidă sau, cum precizează Nathans (1977), orice acid nucleic viral care este infectant poate fi folosit ca vehicul. Totuși, în practică s-au introdus numai anumite plasmide și acizi nucleici virali, cum sînt plasmidele colicinogene (*Col* E_1), colifagul λ și virusul SV40. Preferința pentru aceste vehicule a fost dictată de cunoașterea detaliată

a mapei lor fizice, fapt care facilitează folosirea lor pentru construirea de molecule de recombinanţi.

Plasmidele şi colifagul λ au marele avantaj de a se replica în celulele bacteriene, care — aşa cum se cunoaşte — au o rată rapidă de multiplicare. De aici rezultă posibilitatea multiplicării avantajoase a vehiculului, purtător al informaţiei genetice noi, fapt esenţial pentru producerea pe scară industrială a unui anumit produs biologic codificat de pasager. Aceasta deoarece pasagerul introdus în vehicul — indiferent de natura lui — ajunge sub controlul vehiculului care îl replică şi îl exprimă ca o parte integrantă a moleculei sale. Rezultă că o plasmidă bacteriană, de exemplu, poate să multiplice şi să exprime gena pentru insulină într-o cultură bacteriană, dacă în plasmida respectivă a fost introdusă gena insulinei. Acesta este principiul pe care se bazează obţinerea unor produşi biologic activi importanţi prin tehnologia DNA recombinant.

Referitor la virusul SV40, precizăm că acidul său nucleic are proprietatea de a se integra în DNA celular. În consecinţă, el va putea fi folosit în viitorul apropiat ca vehicul pentru inserţia de gene în cromozomul celulelor de mamifere (Nathans, 1977). Ca atare, el ar putea deveni un agent eficient pentru tratamentul unor maladii care au la bază tulburări metabolice datorate unor defecte genetice; ataşarea de acest vehicul (lipsit însă de zona moleculară care induce transformarea celulară!) a genelor deficiente din genomul organismului bolnavilor respectivi şi integrarea lui în genom ar putea deschide calea terapiei genice.

S-a amintit mai sus că DNA din virusul SV40 are o parte din molecula sa responsabilă de transformarea celulară şi că această parte trebuie modificată în moleculă în momentul în care se pune problema utilizării lui ca vehicul pentru inserţia de gene în genomul celular. S-a ajuns astfel la o situaţie mai generală şi anume la pregătirea sau construcţia vehiculului ideal pentru cercetările de tehnologie cu DNA recombinant.

Construcţia unui vehicul ideal trebuie să ţină cont de două condiţii esenţiale şi anume: a) să se elimine din vehicul toate părţile neesenţiale sau generatoare de efecte nedorite, astfel încît proprietăţile sale de replicare să nu fie afectate şi b) replicarea lui să fie dependentă de anumite condiţii experimentale de creştere a celulelor în care se replică. Dacă prima condiţie are justificarea menţionată, a doua necesită unele precizări. După cum se ştie, construcţia unui vehicul se face în scopul multiplicării unei anumite informaţii genetice pe care în mod natural plasmida sau virusul nu o posedă iniţial. Cum un vehicul poate multiplica orice fragment de DNA străin ataşat de el, aceasta înseamnă că şi inserţia — chiar întîmplătoare — în vehicul a unei informaţii genetice nedorite să fie urmată atît de multiplicarea, cît şi de diseminarea ei. Or, pentru a avea vehiculul sub controlul cercetătorului, el este astfel construit ca multiplicarea lui să se facă numai în condiţii speciale de laborator.

Este deci vorba aici de o măsură de securitate pentru a împiedica biohazardul.

În continuare vor fi descrise caracteristicile principale ale vehiculelor utilizate în tehnologia DNA recombinant.

V.1. Elemente extracromozomale. Plasmide bacteriene

În anul 1959, Ochiai şi Akibe — în mod independent unul de altul — au raportat, în Japonia, un fenomen necunoscut pînă atunci şi anume rezistenţa multiplă a bacteriilor enterice la medicamente (antibiotice), proprietate care poate fi transferată *in vitro* la bacterii susceptibile la medicamente. Investigarea acestui fenomen a pus în evidenţă existenţa în unele bacterii a unor *factori transmisibili de rezistenţă la medicamente* sau pe scurt *factori R* (Watanabe, 1963). Ulterior atît factorii *R*, cît şi factorii de sex *F*, precum şi alte componente bacteriene care nu sînt sub controlul genetic al cromozomilor au primit denumirea generală de *plasmide* sau *elemente extracromozomale*. Caracteristica esenţială şi comună a tuturor plasmidelor este capacitatea lor de propagare proprie, ca atare sau împreună cu oricare genă legată de ele. Clowes (1972) defineşte astfel o plasmidă: „un element care este separat fizic de cromozomul celular şi este capabil de a se perpetua stabil în această stare". Termenul de element extracromozomal este sinonim cu acela de plasmidă. El poate fi definit şi ca un element neesenţial pentru creşterea celulelor normale, putînd fi pierdut sau cîştigat de celule fără efect letal. Acele plasmide care au proprietatea de a ocupa un loc în cromozom se numesc *epizomi*. În timp ce o plasmidă poate sau nu poate fi un epizom, toţi epizomii sînt plasmide. Întrucît definiţia de epizom implică o relaţie genetică între plasmidă şi celulele-gazdă, acelaşi element poate fi un epizom într-o celulă-gazdă şi plasmidă într-o altă celulă.

Este important de precizat că cele mai multe gene ale plasmidelor par să nu aibă echivalenţi cromozomali, de unde rezultă necesitatea evidentă de a face deosebirea între genele plasmidelor şi ale cromozomilor, care uneori pot fi similare fenotipic, dar sînt total distincte din punct de vedere funcţional.

V.1.1. Clasificarea plasmidelor

Pe baza proprietăţilor biologice pe care le prezintă, Cohen (1976) împarte plasmidele în nouă categorii, cu următoarele caracteristici:

1) prezintă abilitatea de a transfera material genetic prin conjugare ......*F*, R_1, Col_1

2) produc bacteriocine ....*ColDF 13 (Enterobacterium cloacae)*, Col_1

3) produc antibiotice,......................*SPC1* (plasmida din *Str. coelicolor)*

4) produc rezistență la metale grele (Cu^{2+}, Hg^{2+}) ....*pI258 (S. aureus)*, R_6

5) produc rezistență la ultraviolete ..... *Col Ib*, R_{46}

6) produc enterotoxine ....*Enterobacteriaceae*

7) determină factorul de virulență (antigen hemolizină K_{88}) ....*Col V, Hly*

8) produc tumorigenicitate la plante ....plasmida *T1 (Agrobacterium tumefaciens)*

9) determină restricție și modificare ....producția de nuclează Eco *R*I și metilază (plasmida din *E. coli RY13*)

În ciuda diversității lor, s-au făcut unele generalizări privind clasificarea plasmidelor. Astfel, plasmidele au fost grupate în două tipuri majore: conjugative și neconjugative.

V.1.1.1. **Plasmide conjugative.** Se spune că o plasmidă este conjugativă sau este clasificată ca factor de sex dacă este autotransmisibilă de la o celulă bacteriană la alta *(conjugare)*. Prezența plasmidelor de acest tip conferă proprietatea de donor celulelor care le posedă. Aceste celule donatoare sînt capabile să transfere plasmide sau alte informații genetice celulelor receptoare.

În general, plasmidele conjugative au masa moleculară mare, de aproximativ 40—70 × 10^6 daltoni, dar mărimea lor este de obicei cuprinsă în domeniul 17—200 × 10^6 daltoni.

Plasmidele conjugative se împart, la rîndul lor, în două categorii: *represate* și *derepresate*, pentru fertilitate. S-a stabilit că marea majoritate a plasmidelor existente în natură sînt represate, ceea ce înseamnă că acestea permit celulelor să transfere plasmida în proporție de numai 0,01%—1% din timp, în condițiile optime de laborator. În schimb, plasmidele derepresate permit tuturor celulelor donatoare să transfere plasmida.

V.1.1.2. **Plasmide neconjugative.** Aceste plasmide nu au capacitatea de a promova conjugarea. Dimensiunea lor este mică, cuprinsă între 0,5—15 × 10^6 daltoni. Se găsesc în copii multiple per celulă. Dacă o plasmidă conjugativă este corezidentă cu o plasmidă neconjugativă, plasmida mai mică (deci cea neconjugativă) poate fi transferată (mobilizată) la o celulă receptoare în timpul conjugării.

Este important de reținut că numai plasmidele neconjugative pot fi întrebuințate pentru introducerea DNA străin în *E. coli K12*. Dintre

plasmidele care au primit avizul pentru a fi folosite ca vehicule în celulele-gazdă *EK1* sau *EK2* (χ *1776*) amintim plasmidele *pMB9*, *pBR313*, *pBR322* și *pSC101* (v. pag. 130). Aceste plasmide au caracteristica comună de a fi transferate (mobilizate) cu o frecvență foarte scăzută în condiții nepermisive de laborator, ceea ce conferă un grad crescut de protecție biologică pentru experimentele de tehnologie a DNA recombinant.

V.1.2. Compoziția fizică a plasmidelor

În 1961 Marmur și colab. aduc prima dovadă directă a naturii fizice a plasmidelor bacteriene. Autorii au transferat activitatea de fermentare a lactozei asociată cu factorul *F'* (*F' lac*$^+$) de la o tulpină de *E. coli* la o tulpină de *Serratia marcescens* și au analizat DNA al tulpinii acceptoare. Ultracentrifugarea analitică în gradient de densitate de CsCl a arătat prezența unui vîrf de DNA caracteristic cromozomului tulpinii *S. marcescens* (ρ = 1,718 g/cm^3) și, ceea ce a fost surprinzător, un umăr corespunzător DNA din *E. coli* (ρ = 1,709 g/cm^3). Trebuie precizat că umărul nu a fost observat niciodată în tulpina parentală de *S. marcescens*, înaintea transferului de factor *F*.

Ulterior, Falkow și colab. (1964) au transferat factorul *F'lac*$^+$ la o tulpină de *Proteus*. Prezența factorului a fost urmărită, alături de alte teste, și prin analiza DNA izolat din *Proteus* înainte și după transfer, precum și după un tratament considerat clasic prin care factorul *F'*

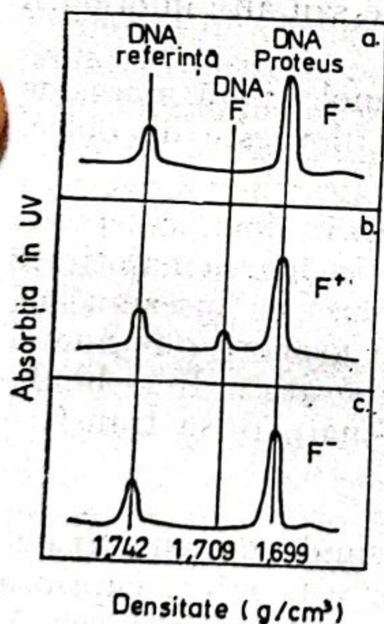


Fig. 34. Prezentarea grafică a profilelor de densitate a DNA din *Proteus* înainte (a) și după (b) transferul factorului *F'lac*$^+$, precum și a DNA din *Proteus* „vindecat" de factorul *F'* prin tratamentul cu acridinoranj (c). Pentru o bună identificare a benzilor de DNA, analiza a mai conținut și un DNA de referință cu o densitate mare (ρ = 1,742 g/cm^3) (după *Falkow* și colab., 1964).

a fost „vindecat" sau înlăturat cu ajutorul acridinoranjului. Figura 34 prezintă rezultatul analizei DNA: comportarea DNA din *Proteus* (ρ = 1,699 g/cm^3) în absența factorului *F'* și în prezența unui DNA de referință (DNA din *Bacillus subtilis* care are densitatea ρ = 1,742 g/cm^3) (fig. 34, *a*) și comportarea DNA din tulpina de *Proteus* căreia i s-a trans-

ferat factorul F' (fig. 34, *b*). Așa cum rezultă din figură, DNA conține un vîrf satelit separat, corespunzător factorului F', la densitatea de 1,709 g/cm³. Este important de remarcat că vîrful satelit nu a mai fost prezent atunci cînd factorul F' a fost „vindecat" de către acridinoranj (fig. 34, *c*). Aceste cercetări au fundamentat ideea că factorul F' este constituit din DNA, idee care s-a generalizat apoi pentru toate plasmidele.

V.1.3. Masele moleculare ale DNA plasmidic

Inițial, estimarea maselor moleculare ale DNA plasmidic s-a făcut pe preparate obținute prin metoda lui Marmur (1961). Condițiile oarecum drastice impuse de metodă, prin care se îndepărtează proteinele din DNA, determină însă fragmentarea moleculei de DNA în segmente cu masa moleculară de aproximativ 10×10^6 daltoni. Odată cu introducerea unor metode mai blînde de extracție a DNA — cum a fost aceea preconizată de Hickson și colab. (1967) — s-a constatat că masele moleculare ale DNA plasmidic sînt uneori chiar mai mari decît 100×10^6 daltoni. În esență, metoda aceasta constă în obținerea mai întîi a sferoplastelor, prin tratarea bacteriilor cu un amestec de lizozim, RN-ază și EDTA, în prezența sucrozei, urmată de tratamentul acestora cu un detergent de tipul DDS, pentru a produce liza celulară. În etapa finală a purificării, proteinele sînt îndepărtate prin tratamentul cu fenol tamponat, iar fenolul se elimină prin dializă.

Estimarea maselor moleculare ale DNA plasmidic se face, în principal, prin trei procedee: unul bazat pe constantele de sedimentare stabilite prin ultracentrifugare, al doilea pe determinările lungimii de contur a moleculei de DNA, efectuate cu microscopul electronic, iar al treilea prin determinarea mobilității electroforetice în gel de agaroză.

În primul caz, constantele de sedimentare se raportează la un DNA standard, care în cele mai multe cazuri este DNA din fagul λ, avînd masa moleculară de 30,8 Mdal (megadaltoni; 1 Mdal = 10^6 dal). În al doilea procedeu, masa moleculară se estimează din relația stabilită de Lang (1970) pentru DNA bicatenar, conform căreia 1 nm = 2,07 Mdal. În ceea ce privește al treilea procedeu, care în ultimul timp a devenit cel mai folosit, el permite determinarea masei moleculare relative în raport cu molecule standard, aflate în aceeași conformație.

Datele actuale permit a se preciza că plasmidele au dimensiuni variabile, între 2 250 de nucleotide (masă moleculară de aproximativ 1,3 Mdal), dimensiune descrisă pentru plasmida minicirculară „criptică" a bacteriei *E. coli 15* (Cozzarelli și colab., 1968) și 400 000 de perechi de nucleotide (masă moleculară de aproximativ 240 Mdal), dimensiunea pe care o ating plasmidele mai complexe ale factorilor de sex F' (Cohen, 1976). Valoarea dată de Cohen pare însă a fi excesiv de mare, dacă

se ține cont de tabelele publicate de Clowes (1972) pentru masele moleculare ale factorilor de sex *F'* în care cifrele variază între 35 și 75 Mdal. În tabelul 13 sînt redate masele moleculare ale unor plasmide.

Tabelul 13

Masele moleculare ale unor plasmide

Plasmida		Masa moleculară (Mdal)	Referința
Factori de sex (*F* și *F'*)	*F*	42	Freifelder (1968)
	F'-gal	48	Freifelder (1968)
	F'-lac	69	Freifelder (1968)
Factori colicinogeni (*Col*)	*Col* E_1	4,8	Roth și Helinski (1967)
	Col E_2	6,0	Bazaral și Helinski (1968)
	Col E_3	6,0	Bazaral și Helinski (1968)
	FVBtct	113	Hickson și colab. (1968)
Factori de rezistență (*R*)	R_{15}	46	Nisoka și colab. (1970)
	$222/R_4$	70	Nisoka și colab. (1970)
	$222/R_3w$	69	Nisoka și colab. (1970)
	R_1	59	Cohen și Miller (1964)

Precizăm că tabelul nu conține masele moleculare ale plasmidelor special construite pentru cercetările de tehnologie a DNA recombinant.

V.1.4. Conformațiile moleculare ale DNA plasmidic

În mod oarecum surprinzător, conformațiile moleculelor de DNA plasmidic sînt asemănătoare celor pe care le prezintă virusurile oncogene DNA: polioma, papiloma și SV40.

În mediu neutru, o primă conformație moleculară descrisă pentru DNA plasmidic este aceea de moleculă bicatenară circulară covalent închisă *(CCI)* sau, în termenii consacrați în literatură *covalently closed circular duplex molecule* (*CCC*). Caracteristic pentru această conformație este faptul că atunci cînd este izolată din celulă ea își asumă o formă „superîncolăcită" *(supercoil)*, adică elicea dublă a DNA se răsucește suplimentar în jurul ei însăși. La această moleculă ambele catene sînt continui, fiind închise covalent (v. fig. 35,*c*).

A doua conformație pe care o poate avea o moleculă de DNA plasmidic este aceea de „duplex circular deschis" (*CD*) *(open circular duplex)* (*OC*). În acest caz molecula este circulară, avînd o catenă continuă, iar a doua discontinuă. Datorită discontinuității uneia din catene ea se mai numește și „cerc crestat" *(nicked circle)* În această conformație molecula de DNA nu se mai superîncolăcește, motiv pentru care se numește și „relaxată" (fig. 35, *b*).

Prin scindarea (crestarea) catenei continui a moleculei de duplex circular deschis ea trece în cea de a treia conformație pe care o poate

avea molecula de DNA plasmidic și anume aceea de „duplex liniar" (fig. 35, *a*).

În mediu alcalin, cînd toate legăturile de hidrogen dintre baze se rup și catenele se desfac, moleculele *CCI* trec într-o conformație compactă, avînd coeficientul de sedimentare relativ (față de duplexul

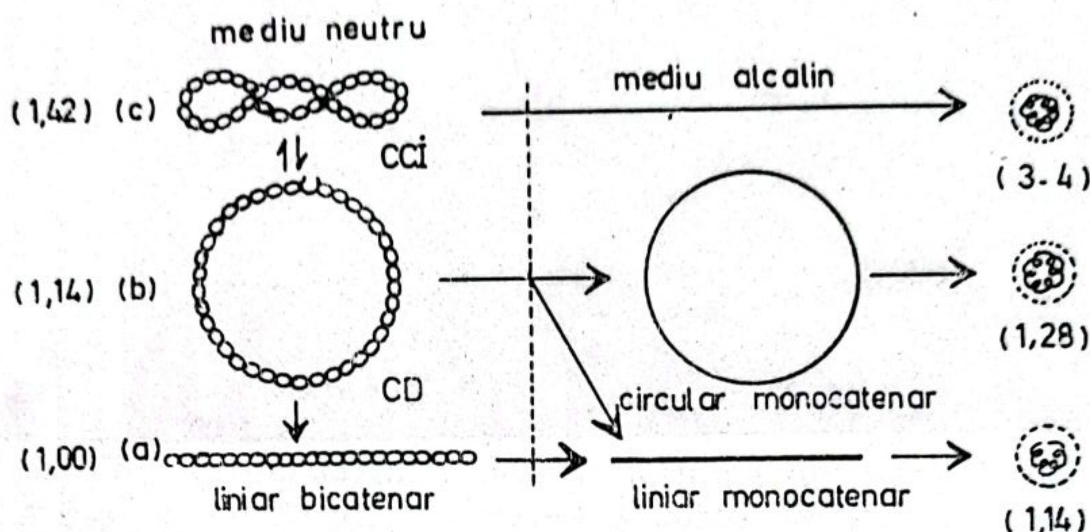


Fig. 35. Diferite conformații moleculare pe care le pot avea moleculele de DNA plasmidic sau DNA din virusurile oncogene SV40, polioma și papiloma în mediu neutru sau alcalin. În paranteză sînt prezentați coeficienții de sedimentare relativi raportați la cel al moleculei de DNA bicatenar (duplex) liniar luat ca referință.

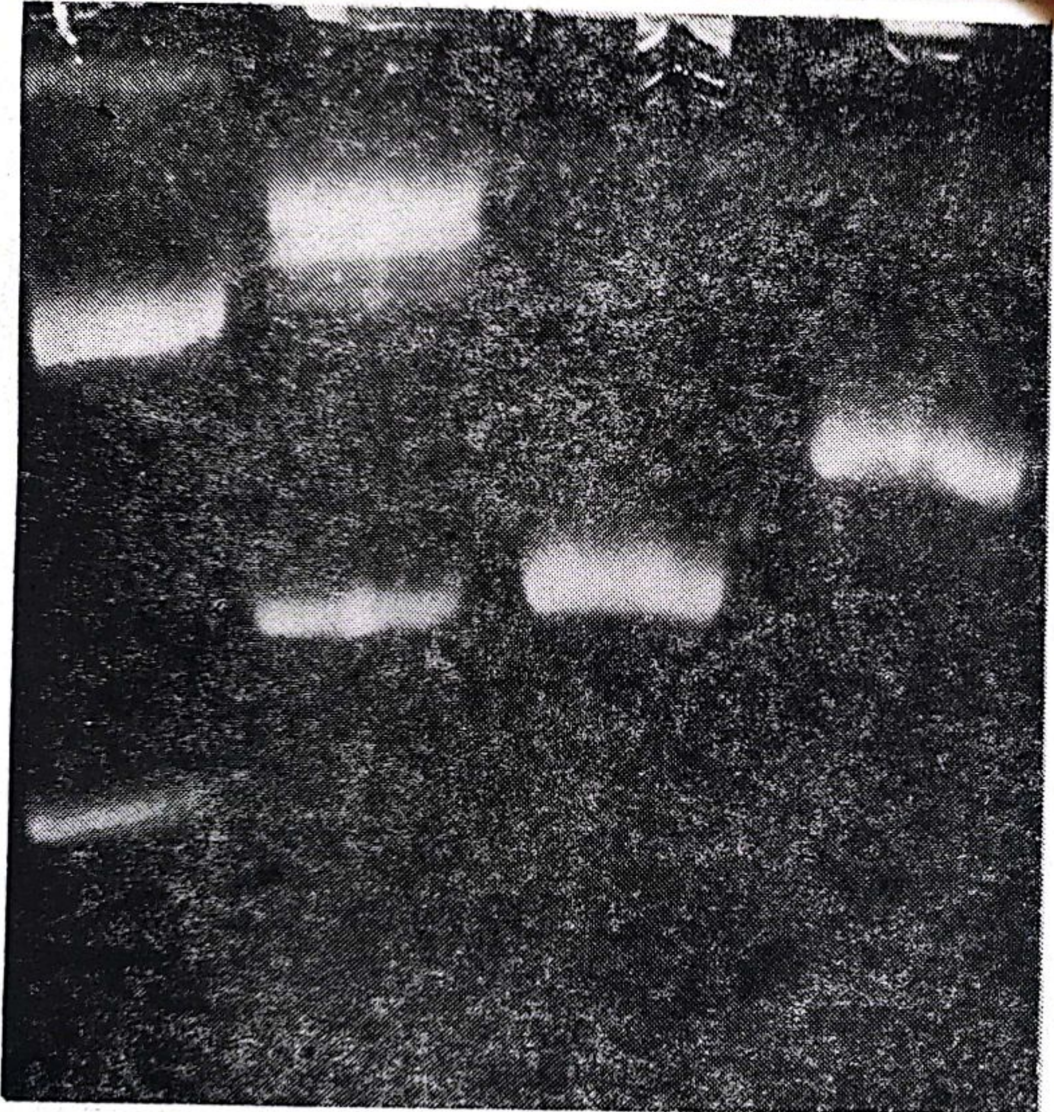
liniar, considerat etalon) crescut de 3—4 ori. Cele două catene ale moleculelor *CCI* fiind întrepătrunse nu se separă. În același mediu, moleculele duplex circulare deschise se denaturează, iar cele două catene ale sale se despart, una dă naștere la un cerc monocatenar cu catena continuă, avînd coeficientul de sedimentare relativ de 1,28, iar a doua devine moleculă monocatenară liniară avînd coeficientul de sedimentare relativ de 1,14.

Sub influența alcaliilor, duplexul liniar se desface în cele două catene liniare avînd coeficientul de sedimentare relativ de 1,14.

Trecerile pe care le suferă conformațiile DNA plasmidic în mediu neutru și alcalin sînt reprezentate schematic în fig. 35.

Din examinarea fig. 35 rezultă clar că atunci cînd se supun ultracentrifugării moleculele de DNA plasmidic, conformațiile lor pot fi ușor recunoscute după coeficientul de sedimentare caracteristic pe care îl prezintă. Moleculele care sedimentează cel mai rapid sînt cele aflate în conformația *CCI*, urmează apoi în ordine cele în conformație de cerc deschis, iar ultimele sedimentează moleculele liniare.

Cele trei conformații pot fi identificate rapid prin metoda electroforezei în gel de agaroză: moleculele *CCI* au mobilitatea electroforetică cea mai mare, iar moleculele *CD* — mobilitatea cea mai mică, formele liniare avînd o mobilitate intermediară (fig. 36). Trecerea moleculelor



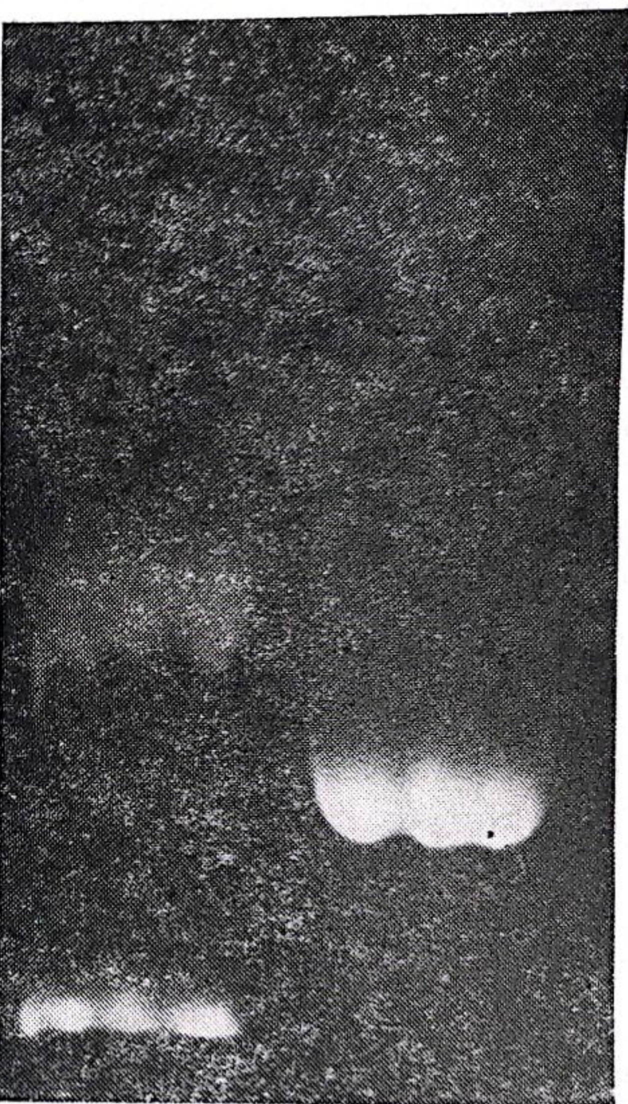


Fig. 36. Electroforeza moleculelor circulare covalent închise (*CCI*), circulare deschise (*CD*) şi liniare ale plasmidelor *pBR313*, *pSF2124*, precum şi a DNA din virusul SV40, puse în evidenţă prin electroforeză în gel de agaroză.

A) Coloana 1-a conţine: DNA *CCI* (spotul de jos), DNA *CD* (spotul de sus) ale plasmidei *pBR313*. Coloana a 2-a conţine: DNA *CCI* (spotul de jos) şi *DNA CD* (spotul heterogen) ale plasmidei *pSF2124*. Coloana a 3-a conţine DNA liniar al plasmidei *pBR313*, iar coloana a 4-a DNA liniar al plasmidei *pSF2124*. Formele liniare ale celor două plasmide s-au obţinut prin incubarea DNA *CCI* + *CD* (din materialul caracterizat în coloanele 1 şi 2) cu enzima de restricţie Eco *RI*. Precizăm că ambele plasmide conţin un situs pentru Eco *RI*.

B) Cele trei conformaţii moleculare ale DNA extras din virusul SV40. Coloana 1-a prezintă conformaţia *CCI* (spotul de jos) şi conformaţia *CD* (spotul de sus). Coloana a 2-a arată conversia celor două conformaţii moleculare în conformaţia liniară de către enzima de restricţie Eco *RI* (după *Popa* şi colab., 1981).

din conformaţia *CCI* (şi *CD*) în cea liniară se face de obicei cu ajutorul enzimelor de restricţie, cu condiţia ca molecula de DNA în conformaţie *CCI* să aibă un singur situs pentru enzima respectivă.

V.1.5. Calculul coeficienţilor de sedimentare a diferitelor conformaţii de DNA

Pentru moleculele de DNA aflate în aceeaşi conformaţie moleculară coeficienţii de sedimentare (exprimaţi în unităţi Svedberg) se calculează din masele lor moleculare, cu ajutorul unor formule empirice, cum se va arăta în continuare.

Pentru moleculele de DNA aflate în conformaţie de duplex liniar coeficientul de sedimentare (*S*) se deduce din formula:

$S^{0}_{20,w} = 2{,}8 + 0{,}00834\ M^{0{,}47}$ (Freifelder, 1970)

în care *M* este masa moleculară a DNA.

În cazul duplexului circular deschis formula devine:

$S^{0}_{20,w} = 2{,}7 + 0{,}0175\ M^{0{,}445}$ (Hudson şi colab. 1968)

iar pentru duplexul circular covalent închis:

$S^{0}_{20,w} = 7{,}44 + 0{,}00243 M^{0{,}58}$ (Hudson şi colab. 1968).

Calculînd raportul coeficienţilor de sedimentare a DNA aflat în diferite forme conformaţionale în funcţie de masele lor moleculare, Freifelder (1970) a constatat că acesta variază după anumite curbe specifice (fig. 37).

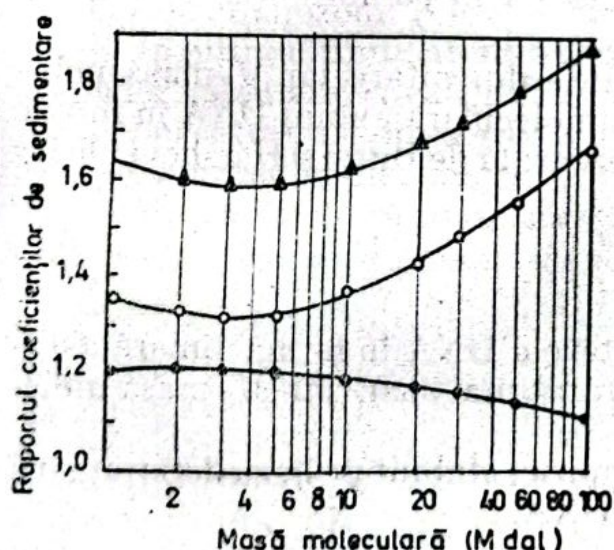


Fig. 37. Variaţia raportului coeficienţilor de sedimentare a moleculelor de DNA aflate în diferite conformaţii moleculare în funcţie de masele lor moleculare (după *Freifelder*, 1970).

Valoarea absolută a coeficientului de sedimentare a unui DNA aflat în conformaţie de cerc deschis (*CD*) sau cerc covalent închis (*CCI*) poate fi determinată printr-o cosedimentare a DNA, respectiv cu un DNA standard, aplicîndu-se cunoscuta formulă:

$$S_1/S_2 = D_1/D_2$$

în care S_1 și S_2 sînt coeficienții de sedimentare, iar D_1 și D_2 distanțele pe care le parcurg în cîmpul centrifugal de la menisc DNA standard și DNA al cărui coeficient de sedimentare urmează să fie determinat.

Pentru exemplificare, în fig. 38 se prezintă aspectul general al unei analize de ultracentrifugare în care s-a cosedimentat un amestec de DNA

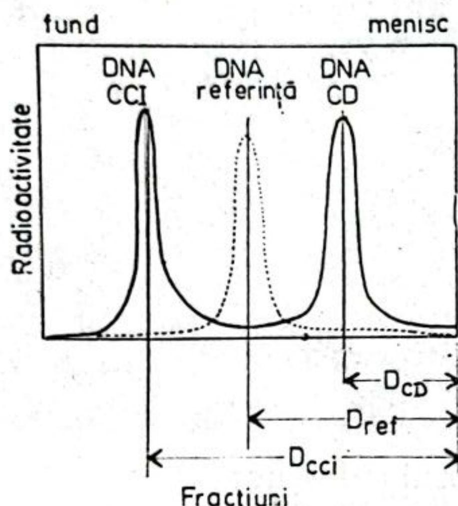


Fig. 38. Comportarea moleculelor *CCI* și *CD* în cursul ultracentrifugării (după *Clowes,* 1972).

conținînd molecule *CCI* și *CD* (avînd coeficienții de sedimentare necunoscuți) împreună cu un DNA standard.

Coeficientul de sedimentare al formei liniare a unui DNA (S_3) se poate stabili aproximativ prin divizarea valorii lui S_1 prin valoarea rezultată din raportul *CD*: liniar, corespunzătoare masei moleculare aproximative stabilite în fig. 38.

Calculul masei moleculare a unui DNA în conformația de duplex liniar se face după cum urmează.

Considerînd că S_2 este coeficientul de sedimentare, iar M_2 masa moleculară a unui DNA de referință, masa moleculară a unui DNA în formă liniară poate fi estimată din formula prezentată de Burgi și Hershey (1963):

$$\frac{S_2}{S_3}=\left(\frac{M_2}{M_1}\right)^{0,38}$$

în care S_3 este coeficientul de sedimentare a DNA în formă liniară (stabilit prin aproximație după cum s-a arătat mai sus), iar M_3 masa moleculară a DNA liniar.

Exponentul 0,38 este un număr empiric, stabilit pe baza determinării maselor moleculare (M) a mai mulți DNA.

V.1.6. Replicarea DNA plasmidic

De la început trebuie precizat că în momentul de față nu există un mecanism general valabil pentru replicarea tuturor tipurilor de plasmide. Mecanismele propuse se bazează pe observațiile experimentale

obținute pe anumite tipuri de plasmide. Ca atare, aceste modele trebuie luate în considerare specific numai pentru plasmidele respective, pînă cînd se vor aduna și alte date experimentale care să asigure generalizarea lor.

Cele mai multe modele de replicare a plasmidelor își au originea în primul model propus de Jacob și colab., 1963. Multe din aspectele acestui model au fost eliminate, dar ideile sale de bază rămîn încă valabile. Pentru moleculele de DNA circulare, capabile a se autoreplica (cazul plasmidelor), se presupune că există două situsuri care controlează replicarea lor. Un situs este reprezentat de gena reglatoare, care produce o substanță difuzabilă denumită „inițiator". Aceasta acționează asupra celui de al doilea situs denumit „operatorul" replicării sau pe scurt „replicator", care determină inițierea replicării din locul său.

Pentru a explica replicarea și moștenirea stabilă a proprietăților plasmidelor de tip *F*, de exemplu, s-a presupus că repliconul acestei plasmide se atașează de un loc al celulei de care se atașează și cromozomul. S-a sugerat că acest loc de atașare este situat pe membrana celulară, care controlează semnalul de inițiere a replicării atît pentru cromozom, cît și pentru plasmidă.

În timpul fiecărei generații celulare, locul de pe membrană împreună cu plasmidele atașate se duplică astfel încît la diviziunea celulară se produce o copie a locului de pe membrană împreună cu plasmida(ele) și cromozomul(mii) atașat la fiecare celulă-fiică. Astfel se asigură moștenirea stabilă a tuturor caracterelor celulare, controlate atît de plasmide, cît și de cromozomi (Clowes, 1972).

În ultimul timp, atenția cercetătorilor care studiază replicarea moleculelor circulare covalente închise (*CCI*) în diferite sisteme biologice s-a concentrat asupra a patru intermediari de replicare posibili, pe care îi prezentăm în fig. 39.

Mecanismele propuse pentru replicarea DNA circular au o caracteristică comună și anume scindarea cercului în timpul replicării cu sco-

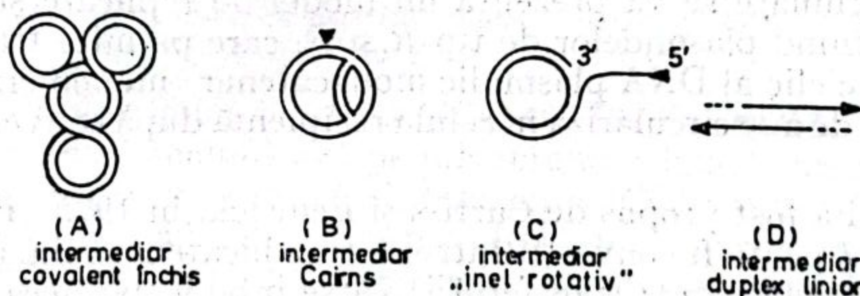


Fig. 39. Patru intermediari posibili care pot apare în cursul multiplicării DNA plasmidic.

pul de a permite separarea celor două catene parentale. Diferențele care există între mecanisme constau atît în natura scindării, cît și a primerului necesar pentru sinteza catenelor-fiice. În cazul intermediarului *A* din fig. 39, care este o moleculă circulară închisă, replicarea presupune

existența unor scizinni și închideri periodice, alături de schimbarea răsucirii moleculei. Astfel de procese ale intermediarului de replicare au fost descrise pentru o serie de molecule de DNA circulare de tipul DNA al virusului SV40, polioma și DNA mitocondrial (Kasamatsu și Vinograd, 1974). Intermediarul *B* prezintă caracteristica „furcii" de replicare, sugerată de Cairns și posedă o sciziune permanentă. În plus, pentru replicare, el are nevoie de un primer (la fel ca și intermediarul *A*) care să inițieze sinteza DNA. Al treilea model de replicare, bazat pe intermediarul *C* de tipul „inelului rotativ", implică existența unei sciziuni stabile pentru adiția deoxiribonucleotidelor noi la catenele parentale. În sfîrșit, intermediarul *D* este o moleculă de DNA bicatenară liniară rezultată din scindarea DNA circular conform mecanismului descris anterior.

Majoritatea cercetătorilor angajați în studiul replicării și transferului plasmidelor preferă modelul de replicare bazat pe sistemul inelului rotativ. În acest model ipotetic se consideră că o proteină inițiator produce o sciziune în DNA plasmidic *CCI*, convertindu-l într-o formă circulară deschisă. Catena ruptă, astfel produsă, poate fi transferată începînd cu capătul ei 5'-terminal. În schimb, celălalt capăt (3'—OH), rămîne fixat prin legături de hidrogen de catena intactă, circulară, a DNA și poate astfel iniția sinteza continuă a catenei de DNA care să o înlocuiască pe cea transferată. Acest mecanism permite transferul continuu al unei singure catene de DNA plasmidic celulelor recipiente, astfel ca cele mai multe dintre ele să primească DNA în exces față de lungimea DNA plasmidic monocatenar monomeric. Transferul unei lungimi mai mari de DNA este necesar pentru păstrarea informației genetice în timpul reformării stării bicatenare. Prin urmare, în forma sa cea mai simplă, modelul inelului rotativ necesită existența în celula donoare a unei proteine-inițiator cu activitate de sciziune, a unei DNA-polimeraze și a unei DNA-ligaze pentru a închide ruperea monocatenei după terminarea transferului.

În continuare se va prezenta un model de replicare și transfer al DNA aparținînd plasmidelor de tip *R* și *F*, care permite transferul discontinuu și ciclic al DNA plasmidic monocatenar monomeric, posedînd capacitatea de a se circulariza în celula recipientă după conversia în formă bicatenară.

Modelul a fost propus de Curtiss și Fenwick, în 1975. El presupune că DNA *CCI* poate fi convertit într-o formă bicatenară liniară cu capete coezive, iar replicarea și transferul DNA se produc pe această matrice. Capetele coezive conțin aproximativ 10—20 de nucleotide, dar pentru motive de simplificare se indică numai cinci perechi de nucleotide.

În fig. 40, *A* este reprezentat DNA plasmidic în stare de repaus, așa cum se găsește în citoplasmă. În momentul în care această moleculă ajunge în contact cu un receptor adecvat ea se asociază cu membrana interioară, iar ambele sale catene sînt scindate pentru a da naștere

la structura circulară deschisă arătată în fig. 40, *B*. Molecula aceasta poate să-şi asume o conformaţie liniară bicatenară avînd capetele monocatenare (fig. 40, *c*). Datorită unei DNA-polimeraze, capetele monocatenare vor deveni şi ele bicatenare, astfel că toată molecula se trans-

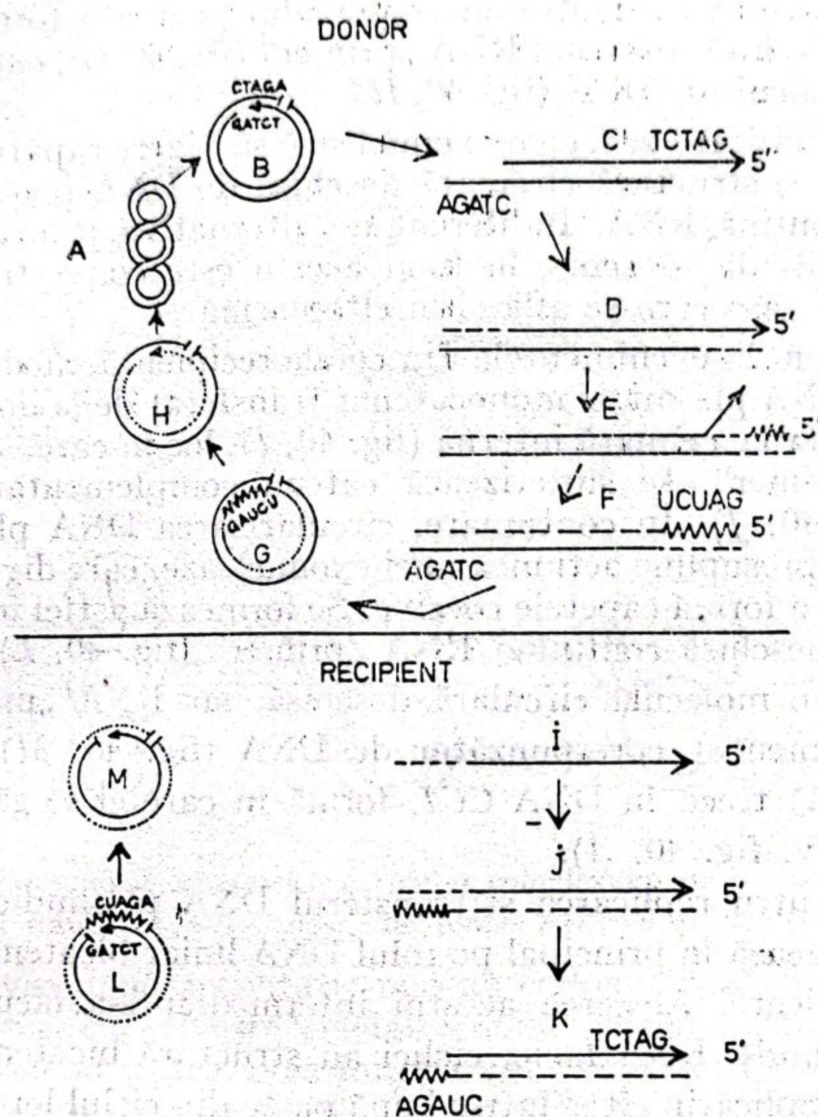


Fig. 40. Modelul replicării şi al transferului DNA plasmidic utilizînd DNA liniar ca matriţă (după *Curtiss* şi *Fenwick*, 1975).

formă într-un duplex liniar bicatenar (fig. 40, *D*). Se consideră că moleculele de acest fel se acumulează pe membrana celulară interioară.

În continuare, se postulează sinteza unui RNA „primer" la capătul 5'-terminal (fig. 40, *E*). Fixarea RNA-polimerazei se face în zona capătului coeziv, iar secvenţa nucleotidelor din acest loc trebuie să conţină situsul de iniţiere a sintezei pentru RNA „primer". Într-o altă variantă ar exista o proteină-iniţiator la capătul 5'-terminal, care ar specifica locul de fixare a RNA-polimerazei. Odată ce se sintetizează catena complementară, o catenă de DNA plasmidic se transferă la o celulă recipientă (fig. 40, *I*), iar molecula bicatenară liniară rămîne

atașată de membrana celulară a celulei donoare. În această etapă se iau în considerare două posibilități pentru reformarea ca donor a DNA plasmidic circular.

Prima dintre acestea, ilustrată în fig. 40, *G—H*, presupune că o exonuclează digeră capătul 3′ al duplexului pentru a forma o moleculă circulară deschisă, păstrînd RNA „primer" (fig. 40, *G*), care este apoi îndepărtat și înlocuit de DNA (fig. 40, *H*).

A doua posibilitate ar fi ca o exonuclează să digere capătul 5′ al moleculei, formînd o structură circulară deschisă de DNA plasmidic, fără ca acesta să conțină RNA. Indiferent de alternativa prin care a luat naștere DNA circular deschis, în final acesta este convertit în formă *CCI* (fig. 40, *A*), așa cum se află el în citoplasmă.

Trecînd acum la evenimentele din celula recipientă, modelul descris presupune că DNA plasmidic monocatenar transferat de la donor se atașează de membrana celulară internă (fig. 40, *I*), loc în care, cu ajutorul unui RNA „primer", se sintetizează catena complementară a DNA plasmidic (fig. 40, *J*). În continuare, circularizarea DNA plasmidic în celula recipient presupune acțiunea unei exonucleaze, care digeră nucleotidele 3′ pentru a forma capetele coezive. Se formează astfel întîi o moleculă circulară deschisă conținînd RNA „primer" (fig. 40, *L*), care este convertită într-o moleculă circulară deschisă, iar RNA „primer" este înlocuit cu segmentul corespunzător de DNA (fig. 40, *M*). În final, această moleculă trece în DNA *CCI*, formă în care el se găsește liber în citoplasmă (v. fig. 40, *A*).

Modelul pentru replicarea și transferul DNA plasmidic prezentat în fig. 40 se bazează în principal pe rolul DNA liniar bicatenar ca intermediar de replicare. Alegerea acestui intermediar s-a făcut pe baza observației că mulți DNA fagici ciclici au structură bicatenară liniară atît în timpul replicării, cît și într-o bună parte din ciclul lor de viață.

V.1.6.1. **Rolul complecșilor de relaxare în replicarea DNA plasmidic.** Procesele biochimice care au loc la originea replicării DNA plasmidic sînt insuficient de cunoscute în momentul de față. Un fapt este însă clar și anume că scindarea uneia sau a ambelor catene de DNA trebuie să se realizeze în timpul replicării cu scopul de a permite dezrăsucirea și separarea catenelor nou scindate. Un candidat pentru această funcție de scindare este complexul de relaxare a DNA plasmidic superîncolăcit, descris pentru plasmidele *Col*, *R* și factorul de sex *F*.

Proprietatea principală a complexului de relaxare a DNA plasmidic izolat din celule de *E. coli* este conversia DNA plasmidic superîncolăcit la o formă circulară deschisă.

Analiza proteinelor din complexul de relaxare a pus în evidență trei componente cu masele moleculare relative de 60 000, 16 000 și 11 000. Este de reținut faptul că după tratamentul cu DDS al complexului de relaxare, proteina de 60 000 daltoni rămîne asociată cu catena scindată a DNA circular deschis, ceea ce sugerează că această proteină este legată covalent de catena de DNA. Se consideră că proteina de 60 000

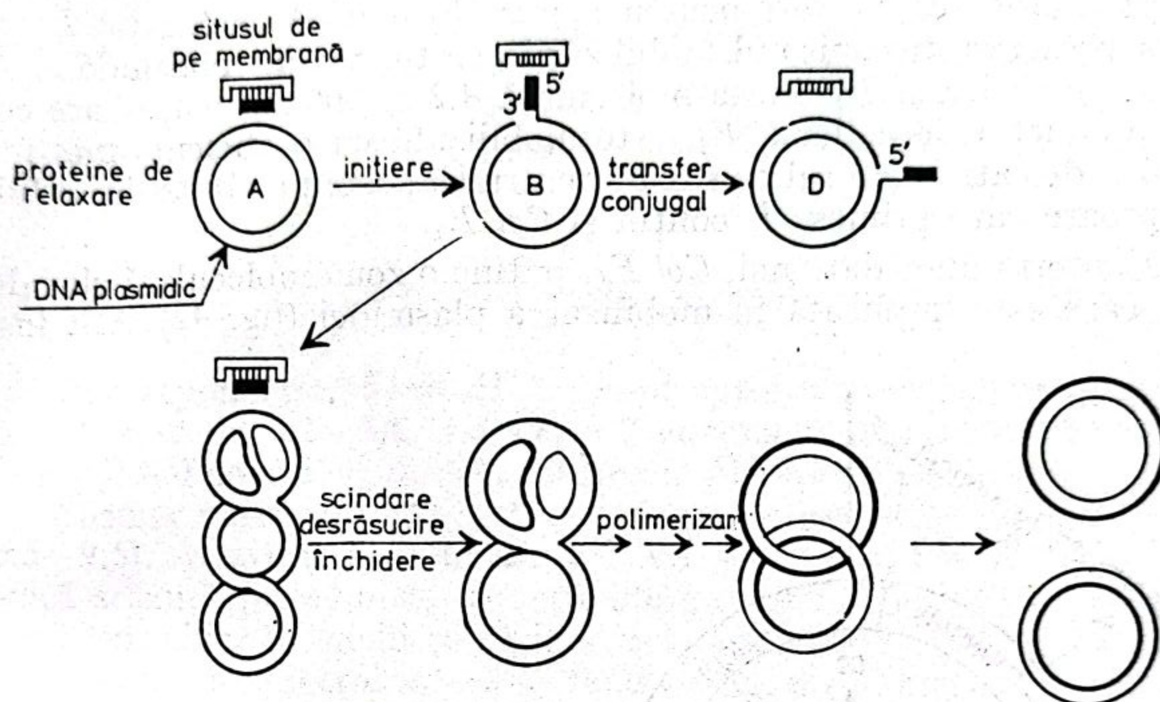


Fig. 41. Prezentarea schematică a rolului complexului de relaxare în replicarea și transferul DNA plasmidic (după *Helinski* și colab., 1974).

ar putea avea două activități: una de endonuclează și alta de transferază. În ceea ce privește celelalte două proteine, ambele sau numai una dintre ele ar putea avea funcția unui represor al activității endonucleazice a proteinei de 60 000 daltoni (Helinski și colab., 1974).

Rolul posibil al complexului de relaxare în replicarea și transferul conjugat al DNA plasmidic este prezentat în fig. 41. În acest model se propun mai multe funcții pentru complexul de relaxare și anume: promovează asocierea DNA plasmidic cu situsul de replicare de pe membrană (A), catalizează atît scindarea unei catene a DNA plasmidic în locul specificat de către un „semnal", cît și formarea legăturii covalente între componenta proteică și capătul 5'-terminal al catenei scindate (B), închide catena scindată după dezrăsucirea catenelor de DNA (C), facilitează transferul catenei scindate în celula recipientă în timpul conjugării bacteriene *(bacterial motion)* (D).

Se consideră că legarea proteinei de DNA mai are și rolul de a determina conservarea conținutului ridicat de energie a legăturii fosfodiesterice scindate, de a proteja catena scindată de acțiunea exonucleazelor și de a facilita transferul DNA plasmidic la celula recipientă.

V.1.7. Mobilizarea (transferul) plasmidelor curent folosite în tehnologia DNA recombinant

Cercetări curente au arătat că mobilizarea plasmidelor nu se face accidental sau printr-un proces pasiv. Întrucît plasmidele *Col* E_1 și unele derivate ale sale ca *pMB9*, *RSF2124*, *pBR313* și altele sînt curent folosite ca vectori pentru a introduce DNA străin în *E. coli*, se va prezenta mecanismul mobilizării acestui tip de plasmidă.

De obicei, *Col* E_1 (masa moleculară $4,2 \times 10^6$ daltoni), care codifică producția de colicină E_1, este mobilizată cu o eficiență mai mare de 50% de către factorul de sex *F*, pentru că peste jumătate din celulele receptoare care primesc *F* conțin și *Col* E_1.

Conform unor date noi, *Col* E_1 conține o zonă moleculară clar definită care este implicată în mobilizarea plasmidei (fig. 42). Atît inser-

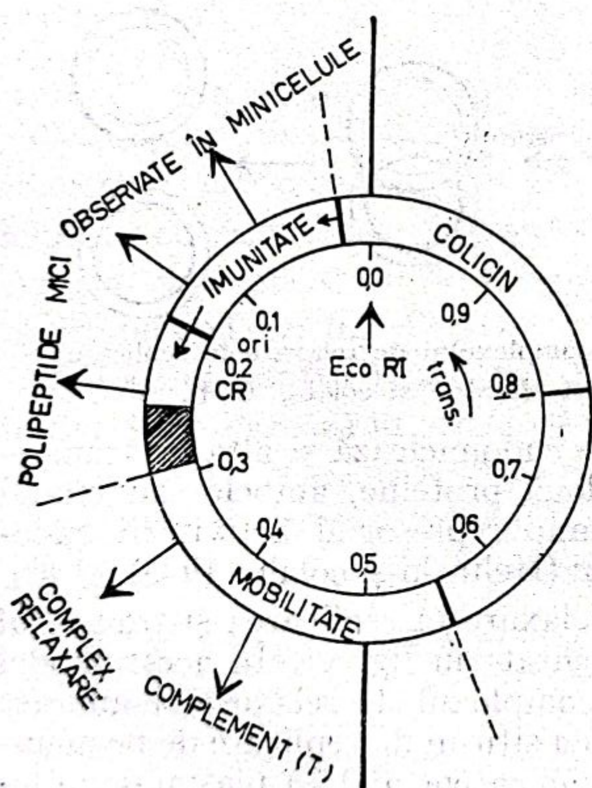


Fig. 42. Harta funcțională a plasmidei *Col* E_1 ($4,5 \cdot 10^6$ daltoni).

țiile, cît și delețiile din aceste regiuni conduc la apariția de fenotipuri (*mob*⁻): mai puțin de 1 din 10^5 recipienți primesc o plasmidă *Col* E_1 *mob*⁻ față de *Col* E_1 *mob*⁺.

Inserțiile lîngă poziția 0,27 (zona hașurată din fig. 42) în cazul plasmidei *RSF2124*, îi modifică mobilitatea. Mutanții *Col* E_1 *mob*⁻ au cantități mici de complex de relaxare (complex proteic găsit în DNA *Col* E_1) capabil de a introduce o crestătură într-o catenă de DNA plasmidic. Această observație sugerează rolul complexului de relaxare în procesul de mobilizare.

(1—3 mM) (Olivera și Lehman, 1967; Zimmerman și colab., 1967) sau Mn^{2+} (0,2—1,0 mM) (Zimmerman și colab., 1967).

Concentrația optimă de ioni Mg^{2+} este de 10 mM; la 3 și la 30 mM Mg^{2+} se constată 35% și, respectiv 80% din activitatea maximă. Ionii de Mn^{2+} îi pot înlocui pe cei de Mg^{2+} numai parțial. Concentrația optimă de Mn^{2+} 10 mM restabilește doar 25% din activitatea manifestată în prezența unei concentrații identice de ioni Mg^{2+}. Exprimarea activității DNA-ligazei *T4* necesită și prezența ditiotreitolului, omiterea lui reducînd activitatea enzimatică cu 75%. Înlocuirea ditiotreitolului cu β-mercaptoetanol duce la o scădere cu 60% a activității acestei enzime (Weiss, 1971). Încă nu este complet elucidat rolul Ca^{2+} în cursul reacției și există controverse asupra acestui punct (Olivera și Lehman, 1967; Zimmerman și colab., 1967).

IV.3.4. *p*H optim și stabilitate

În tampon Tris 66 mM-HCl, *p*H-ul optim de desfășurare a reacției ligazice este de 7,2—7,8. La *p*H 6,9 enzima mai prezintă doar 46%, iar la *p*H 8,0 doar 65% din activitatea la *p*H 7,6 (Weiss, 1971).

Enzima purificată este activă într-un domeniu de *p*H relativ larg (6,5—9,5). Activitatea de legare a DNA scade rapid în medii cu tărie ionică scăzută (< 40 mM). Fracțiunile de enzimă purificată se inactivează lent chiar în medii cu tărie ionică moderată (0,1 M) și chiar dacă sînt păstrate în glicerol la —5°C, fenomen căruia Zimmerman și Oshinsky (1969) i-au dat următoarea explicație: enzima ar putea exista în trei forme (una complet activă *I*, a doua cu afinitate mai scăzută pentru substratul de DNA *II* și o a treia lipsită de activitate *III*). Inactivarea s-ar datora în principal trecerii formei *I* în *II* și apoi în *III*. Adăugarea de serumalbumină bovină (concentrație finală 0,1%) la soluțiile de DNA-ligază previne inactivarea în medii de tărie ionică moderată. Încălzirea enzimei timp de 5 minute la 60°C provoacă inactivarea ei totală.

Spre deosebire de *E. coli* DNA-ligaza, enzima de legare izolată din *E. coli* infectată cu bacteriofagul *T4* s-a dovedit mai stabilă: după o păstrare de cca 6 luni la 0°C se înregistrează o pierdere de aproximativ 50% din activitate, dar dacă probelor enzimatice li se adaugă 50% glicerol se pot păstra pînă la șase luni, la —15°C, fără o pierdere semnificativă a activității (< 10%) (Weiss, 1971).

IV.3.5. Temperatura optimă

Viteza reacției enzimatice este mult influențată de temperatură: la 0°C, 10°C și 20°C se observă doar 10, 20 și, respectiv 55% din viteza la 37°C; la 45°C se regăsește doar 20% din activitatea la 37°C și se observă inactivarea ireversibilă a enzimei.

IV.4. Izolarea şi purificarea DNA-ligazelor

Pentru izolarea şi purificarea ligazelor au fost puse la punct mai multe metode, în general greoaie şi laborioase, comportînd un număr variabil de etape, dintre care nu lipsesc însă precipitarea cu sulfat de amoniu, pentru îndepărtarea excesului de proteine celulare, şi cromatografia pe coloană de DEAE-celuloză în gradient de săruri, care are drept scop separarea ligazelor de enzimele cu acţiune exonucleazică, ce eluează la alte concentraţii saline, mai mici.

În cazul *E. coli* DNA-ligazei, Olivera (1971) dă următoarea schemă de izolare şi purificare (tabelul 9):

Tabelul 9

Purificarea *E. coli* DNA-ligazei (după Olivera, 1971)

Fracţiunea	Volumul total (ml)	Activitatea totală (unit.)	Activitatea specifică (unit./mg proteină)
I. Extract celular bacterian	172	8 680	2,4
II. Precipitare cu streptomicină	735	(3 620)*	(2,6)*
III. Precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$	52	5 040	8,1
IV. Cromatografie pe DEAE-celuloză	38	2 800	75
V. Cromatografie pe fosfoceluloză	35	1 022	1575 (12% din activitatea iniţială)

* Streptomicina reziduală inhibă reacţia de testare a activităţii ligazice, dînd rezultate false în această etapă.

Metoda propusă a permis o purificare de 650 ori a enzimei.

Spargerea celulelor pentru obţinerea extractului se realizează prin ultrasonicare. Resturile celulare se îndepărtează prin centrifugare, iar la supernatant se adaugă streptomicină, pentru îndepărtarea acizilor nucleici înalt polimerizaţi. Se centrifughează, iar noul supernatant care rezultă se tratează imediat cu sulfat de amoniu; se obţine astfel fracţiunea III, care în continuare, se supune cromatografiei pe coloană de DEAE-celuloză. Eluţia se face în gradient de săruri. Fracţiunea enzimatică activă suferă o nouă cromatografie, pe fosfoceluloză. Noile fracţiuni în care eluează enzima se unifică şi se concentrează prin dializă contra sucroză solidă. În acest mod se recuperează cca 75% din activitatea enzimei cuprinsă în fracţiunea V.

În extractele celulare enzima poate exista sub formă liberă sau legată ca adenilatligază. Cromatografia pe fosfoceluloză este ineficace dacă enzima este legată, deoarece această formă nu se adsoarbe bine

pe fosfoceluloză; de aceea se recomandă ca tampoanele de lucru să conțină EDTA, care determină ca enzima să existe în special sub formă liberă.

Un procedeu analog de purificare, cu mici diferențe, au folosit Weiss și colab. (1968) și Weiss (1971) în cazul DNA-ligazei *T4* (tabelul 10):

Tabelul 10

Purificarea DNA ligazei T4 (după Weiss și colab., 1968)

Etapa	Activitate totală (unit. × 10^{-2})	Activitate specifică (unit./mg prot.)	Proteină (mg/ml)	Randament (%)
I. Extract celular bacterian	153	11,6	11,4	100
II. Precipitare cu streptomicină	98	2,0	5,0	64
III. Precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$	48	2,8	15,2	31
IV. Cromatografie pe DEAE-celuloză I	38	3,6	3,5	25
V. Cromatografie pe DEAE-celuloză II	16 (24)	14 (21)	0,15	10
VI. Cromatografie pe fosfoceluloză	9 (14)	—	0,01	6
VII. Concentrare	8 (12)	1700(2500)	0,08	5

Fracțiunea VII — eluatul de pe fosfoceluloză, concentrat — a fost purificată de cca 1000 ori față de produsul inițial.

Recent, Moore și James (1976) au simplificat metoda propusă în 1968 de Weiss și colab. (1968), ceea ce a ușurat și urmărirea activității enzimatice pe parcursul procesului de purificare. Ei au folosit schema din tabelul 11:

Tabelul 11

Purificarea DNA-ligazei T4 (după Moore și James, 1976)

Fracțiune	Volum (ml)	Proteina (mg/ml)	Proteina totală (mg)	Activitate (unit. × 10^{-6})
I. Extract celular total	400	26,5	10600	—
(Precipitare cu streptomicină)				
II. Precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$	100	4,6	460	—
III. Eluat de pe fosfoceluloză	255	0,15	38	3,6
IV. Eluat de pe DEAE-celuloză	250	0,045	11,3	1,9
V. Concentrat cu glicerol	68	0,16	10,9	1,7

De reținut inversarea ordinei în care se face cromatografia pe fosfoceluloză: în procedeul propus de Weiss și colab. (1968) aceasta urma separării pe DEAE-celuloză; de asemenea, s-a renunțat la una dintre cele două separări pe DEAE-celuloză (compară cu tabelul 10).

Folosind tehnologia DNA recombinant, Panasenko şi colab. (1977) au construit un hibrid de *E. coli* şi bacteriofag λ, hibrid care conţine gena *E. coli* DNA-ligazei. În acest caz, bacteriofagul λ a fost folosit ca vehicul pentru amplificarea genei; s-a reuşit o creştere de cca 500 ori a activităţii ligazei în acest lizogen stabil. În extractele celulare bacteriene infectate cu acest recombinant, ligaza ajunge să reprezinte cca 5% din proteinele celulare, ceea ce uşurează considerabil procesul de purificare a enzimei, pentru care Panasenko şi colab. (1978) propun următoarea schemă (tabelul 12):

Tabelul 12

Purificarea DNA-ligazei din recombinantul *E. coli* 594 *gt4 lop* 11 *lig*+*S7* (Panasenko şi colab., 1978)

Etapa	Proteină (mg/ml)	Activitate totală (unit. × 10^{-5})	Activitate specifică (unit./mg prot.)	Randament %
I. Extract celular	21	4,7	75	(100)
II. Precipitare cu Polymin P	—	5,4	—	112
III. Precipitare cu $(NH_4)_2SO_4$	11,8	4,4	375	94
IV. Cromatografie pe fosfoceluloză	0,015	2,0	6000	43
Concentrarea fracţiunii IV	7,0	2,1	6300	44

Metoda permite obţinerea unei enzime cu o puritate mai mare de 95%, sub forma unui pic foarte strîns la cromatografia pe fosfoceluloză (fig. 28).

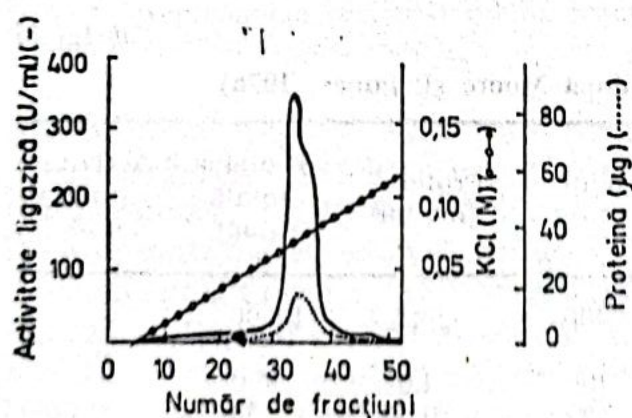


Fig. 28. Cromatografia pe fosfoceluloză a fracţiunii a III-a, cu obţinere de DNA-ligază pură (după *Panasenko* şi colab., 1978).

IV.5. Testarea activităţii DNA-ligazice

Activitatea DNA-ligazelor se exprimă în unităţi. Pentru unitatea de DNA-ligază *T4*, Weiss şi colab. (1968) dau următoarea definiţie: unitatea este acea cantitate de ligază care catalizează în 20 minute

conversia unui picomol * de ^{32}P-fosfomonoesteri într-o formă rezistentă la acțiunea fosfatazei alcaline, iar Kleppe și colab. (1970) aduc unele mici modificări de enunț: unitatea este acea cantitate de enzimă care catalizează transformarea într-un minut a unui pM de capete ^{32}P-5'-fosfat din dT_{10} la o formă nesusceptibilă la acțiunea fosfatazei alcaline bacteriene, în condiții standard (Gupta și colab., 1968).

Pentru testarea activității ligazice s-au descris patru clase majore de reacții și anume:

A. formarea adenilatligazei, intermediar acidoinsolubil, prin reacția dintre enzima liberă și NAD^+ marcat la restul de adenină (Zimmerman și Oshinsky, 1969);

B. conversia unui DNA liniar la o formă circulară și detectarea lui fie prin: a) proprietăți de sedimentare alterate (Gefter și colab., 1967; Gellert, 1967), fie prin b) absența susceptibilității la acțiunea exonucleazelor (Modrich și Lehman, 1970; Olivera și colab., 1968) sau prin alte metode;

C. conversia unui DNA denaturat la o formă renaturabilă și detectarea DNA nativ prin adsorbția sa selectivă pe hidroxiapatită (Zimmerman și colab., 1967);

D. conversia capetelor 5'-fosfomonoesterice ale catenelor de DNA la diesterfosfați, nesusceptibili la acțiunea fosfatazei alcaline de origine bacteriană (Olivera și Lehman, 1967a; Weiss și Richardson, 1967).

Toate aceste metode sînt general valabile pentru testarea oricărei activități ligazice, cu excepția primei grupe de reacții (A), care nu se poate aplica decît acelor DNA-ligaze care — pentru a-și desfășura acțiunea — au nevoie de prezența NAD^+ drept cofactor.

Metoda A. folosește cel mai simplu substrat; totuși nu se poate folosi decît după ce probele au fost dializate, pentru îndepărtarea NAD^+ endogen. Metodele B. și C. folosesc drept substrat DNA de bacteriofag λ (sau oricare DNA bacteriofagic cu o structură similară). Dacă se urmărește testarea unui număr mare de probe — cazul procesului de izolare și purificare a enzimei — metodele acestea se dovedesc greoaie. În plus, metoda B. a) este deosebit de sensibilă la prezența endonucleazelor care ar putea impurifica preparatele de ligază. Metodele B. a) și D. sînt convenabile pentru a fi folosite cînd este nevoie să se facă screening-ul unui număr mare de probe. Există și aici un inconvenient și anume exonucleaza cu care se lucrează (metoda B. b)) trebuie să fie lipsită de activitate endonucleazică. Pentru a da rezultate bune, metoda D. necesită un γ-^{32}P-ATP cu o activitate specifică ridicată, precum și o polinucleotidkinază cu un înalt grad de puritate.

În continuare se vor analiza pe rînd cîteva din grupele de metode de interes general, cu aplicabilitate pentru toate tipurile de ligază, deci grupele B., C., D.

* 1 picomol (pM) = 10^{-12} moli

IV.5.1. Conversia DNA liniar la forma CCI

Această conversie se poate pune în evidență prin diverse mijloace.

IV.5.1.1. **Ultracentrifugare.** Ca urmare a acțiunii ligazice asupra formelor liniare de DNA (de natură bacteriofagică, de exemplu λ sau *T*7) apar forme *CCI* DNA, cu proprietăți de sedimentare în gradient de densitate deosebite și anume: formele *CCI* prezintă o densitate mai mare decît cele liniare. DNA bacteriofagici amintiți mai sus au la capetele structurii lor bicatenare regiuni monocatenare complementare; acestea pot interacționa fie intracatenar, cu formare de molecule circulare, legate prin punți de hidrogen, fie intercatenar și atunci apar dimeri sau alți oligomeri, formați tot prin punți de hidrogen. Atît monomerii, cît și oligomerii circulari prezintă în molecula lor dublu catenară unele crestături *(nicks)* monocatenare, care constituie locul de acțiune al DNA-ligazelor.

Moleculele *CCI* se detectează după formare prin rapida lor sedimentare (de 3,6—4 ori) în gradient de sucroză în mediu alcalin, față de moleculele liniare.

Lucrînd cu DNA din bacteriofagul *T*7 ca substrat pentru testarea activității DNA-ligazei *T*4, Weiss și Richardson (1967) au obținut următoarele rezultate (fig. 29):

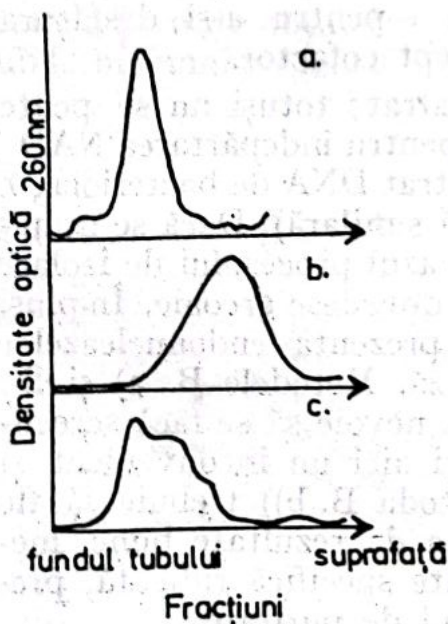


Fig. 29. Ultracentrifugarea analitică în gradient de sucroză și în mediu alcalin a produșilor reacției ligazice: a) DNA *T7* martor; b) DNA *T7* cu crestături realizate prin tratament cu DNază pancreatică, incubat cu ligază în absența ATP; c) DNA *T7* cu crestături (vezi mai sus) incubat cu ligază în prezența ATP. Preparatele de DNA s-au denaturat anterior ultracentrifugării (după *Weiss* și *Richardson*, 1976).

Se observă că DNA *T*7 intact (fig. 29, *a*) are o densitate mai mare decît cel cu crestături într-una din catene (fig. 29, *b*), mergînd spre partea de jos a tubului. Prin acțiunea DNA-ligazei *T*4 o parte din materialul lezat se repară, el comportîndu-se la ultracentrifugare asemănător cu martorul (fig. 29, *c*).

IV.5.1.2. **Electroforeză.** Metoda folosește ca substrat pentru acțiunea ligazei DNA de bacteriofag λ, care a fost anterior supus hidrolizei cu endonucleaza de restricție Eco *R*I, rezultînd șase fragmente cu următoarele mase moleculare: 12×10^6 D **(1)**, 4×10^6 D **(2)**, $3{,}3 \times 10^6$ D (două fragmente identice) **(3, 4)**, $2{,}7 \times 10^6$D **(5)**, $2{,}1 \times 10^6$D **(6)**. În momentul în care ligaza testată este pusă în contact cu aceste fragmente de DNA se constată dispariția de pe electroforegramă a benzii cu masa de $2{,}1 \times 10^6$D; are loc conversia benzilor 1 și 6, care se leagă inițial prin punți de hidrogen, la o formă *CCI*, nedenaturabilă termic (fig. 30). Punerea în evidență a fragmentelor de DNA se face în UV, prin colorare cu bromură de etidiu.

IV.5.1.3. **Microscopie electronică.** Colorații specifice pot pune în evidență acizii nucleici. Pe preparate se pot deosebi formele *CCI* de cele

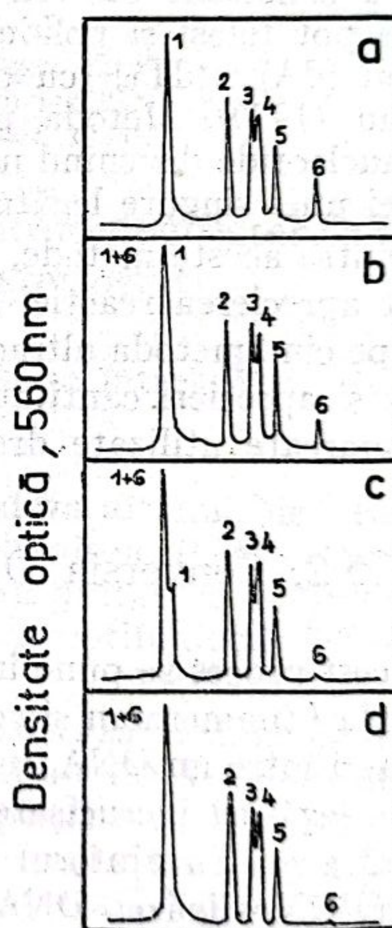


Fig. 30. Densitograma produșilor reacției ligazice, separați electroforetic. S-a înregistrat intensitatea fluorescenței benzilor de DNA colorat cu bromură de etidiu. Cantitatea de enzimă folosită a variat, crescînd de la a) (o unitate) la d)(2 unități) (după *Moore* și *James*, 1976).

liniare. Moleculele rezultate prin circularizare intracatenară cu punți de hidrogen se aduc anterior colorării la conformația de DNA liniar. Metoda a fost pusă la punct de Sgaramella în 1972.

IV.5.1.4. **Ultrafiltrare.** Filtrele nitrocelulozice reușesc să facă discriminarea între diverse conformații ale DNA: liniar, circular cu punți de hidrogen — pe de o parte — și circular deschis (*CD*) și circular covalent

închis (*CCI*) — pe de altă parte. Primele forme enumerate trec prin filtre, în timp ce celelalte două sînt reținute. Drept substrat se utilizează, și în acest caz, ^{3}H- sau ^{32}P-DNA λ sau analog, după cum au preconizat Reiser și colab. (1976). Substratul, adus la forma sa liniară, se incubează cu probele de ligază, iar apoi reacția se stopează cu un detergent, de exemplu DDS. „Cercurile Hershey" (formate prin punți de hidrogen) sînt aduse la forma liniară. Se face apoi filtrarea. Formele *CD* și *CCI* rămîn pe filtru și se poate măsura radioactivitatea reținută, din care se apreciază gradul de legare.

IV.5.1.5. **Enzimatic, cu exonuclează.** Moleculele de tip *CCI*, formate prin legarea capetelor 3′-hidroxil și 5′-fosfat cu apariția legăturilor fosfodiesterice, devin insensibile la acțiunea exonucleazei III, după cum au constatat Olivera și Lehman (1967 a). Ca substrat, în acest caz, se pot folosi și polideoxiribonucleotide sintetice, de tipul copolimerului $(dA)_n \cdot (dT)_n$ (cu cca 1000 nucleotide) propus de Modrich și Lehman (1970). Metoda prezintă o mare sensibilitate, aproximativ 1000 nucleotide devenind nesusceptibile la exonucleaza III ca urmare a sintezei unei singure legături fosfodiesterice.

Dintre aceste metode, metoda electroforezei și cea electronooptică permit aprecierea reacției ligazice mai ales din punct de vedere calitativ, pe cînd metoda ultracentrifugării, a ultrafiltrării și cea enzimatică permit și aprecieri cantitative asupra reacției ligazice, pe baza produselor marcate utilizate drept substrat.

IV.5.2. Conversia DNA denaturat la forme renaturabile

Acest proces se pune în evidență prin adsorbție selectivă pe hidroxiapatită (Zimmerman și colab., 1967). În esență el constă în formarea de dimeri între un DNA liniar marcat și un DNA de bacteriofag λ care conține legături încrucișate *(cross lincks)* intercatenare, induse special în acest scop, cu ajutorul unor agenți alchilanți. După legarea lor cu ajutorul DNA-ligazei, DNA se denaturează cu alcalii, care desfac toate legăturile în afara celor covalente. Apoi *p*H-ul se corectează la neutru, iar DNA se adsoarbe pe hidroxiapatită, în condiții în care se adsorb numai formele native, nu și cele denaturate. Spre deosebire de DNA normal, nativ, cel care conține în molecula sa legături încrucișate se renaturează imediat după readucerea probei la *p*H neutru. Împreună cu el rămîne și catena de DNA liniar atașată sub acțiunea DNA-ligazei, iar cealaltă catenă nu se adsoarbe. Măsurarea activității reținute pe coloana de hidroxiapatită permite evaluarea reacției ligazice, iar DNA cu legături încrucișate constituie un purtător pentru oricare

DNA marcat ce i s-a alipit ca urmare a activității ligazice. Schematic, procesul de legare a unui DNA de DNA cu legături încrucișate se poate rezuma ca în fig. 31 (Gellert, 1971).

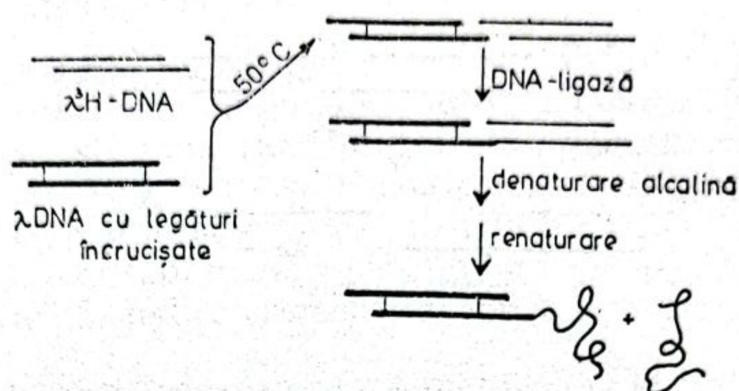


Fig. 31. Formarea dimerilor (și a unor agregate mai mari) prin legături de hidrogen între ^{3}H-DNA de bacteriofag λ și DNA λ cu legături încrucișate intramoleculare (după *Gellert*, 1971).

IV.5.3. Conversia capetelor 5′ $^{-32}$P-fosfomonoesterice ale catenelor de DNA la diesterfosfați

Ca urmare a acestei conversii rezultă o serie întreagă de efecte, printre care:

IV.5.3.1. **Pierderea susceptibilității la fosfataza alcalină de origine bacteriană.** O serie de autori ca Weiss și Richardson (1967), Olivera și Lehman (1967 a), Gefter și colab. (1967) au arătat că activitatea ligazică poate fi determinată și prin testul susceptibilității DNA la fosfataza alcalină.

Testul are la bază următorul principiu: fosfataza alcalină hidrolizează grupările fosfat situate la capetele 5′-fosfat ale DNA. Or, în situația în care grupările 5′-fosfat terminale au dispărut prin interacțiunea lor cu grupările terminale 3′-hidroxil (v. mecanismul de acțiune al ligazei), tocmai datorită acțiunii ligazei, susceptibilitatea DNA la fosfataza alcalină dispare (fig. 32).

În prima etapă, substratul marcat se scindează (fig. 32, *a*) cu ajutorul DN-azei I, obținîndu-se în molecula bicatenară crestături avînd capete 3′-hidroxil și 5′-fosfat adiacente (fig. 32, *b*). La rîndul lor, aceste molecule constituie substrat pentru exercitarea acțiunii ligazice. În prezența enzimei de legare se reformează molecula inițială, reparată (fig. 32, *c*), asupra căreia fosfataza alcalină nu poate acționa, întrucît nu are capete fosfat libere. Dimpotrivă, dacă fosfataza este pusă în contact cu componenta *b*) din fig. 32, ea își va exercita acțiunea de scindare a grupărilor fosforice. În acest caz însă, ligaza nu va mai putea

interveni în repararea crestăturilor, decît după ce capetele 5'-hidroxil generate de fosfatază (fig. 32, *d*) vor fi readuse la forma 5'-fosfat, cu ajutorul polinucleotidkinazei.

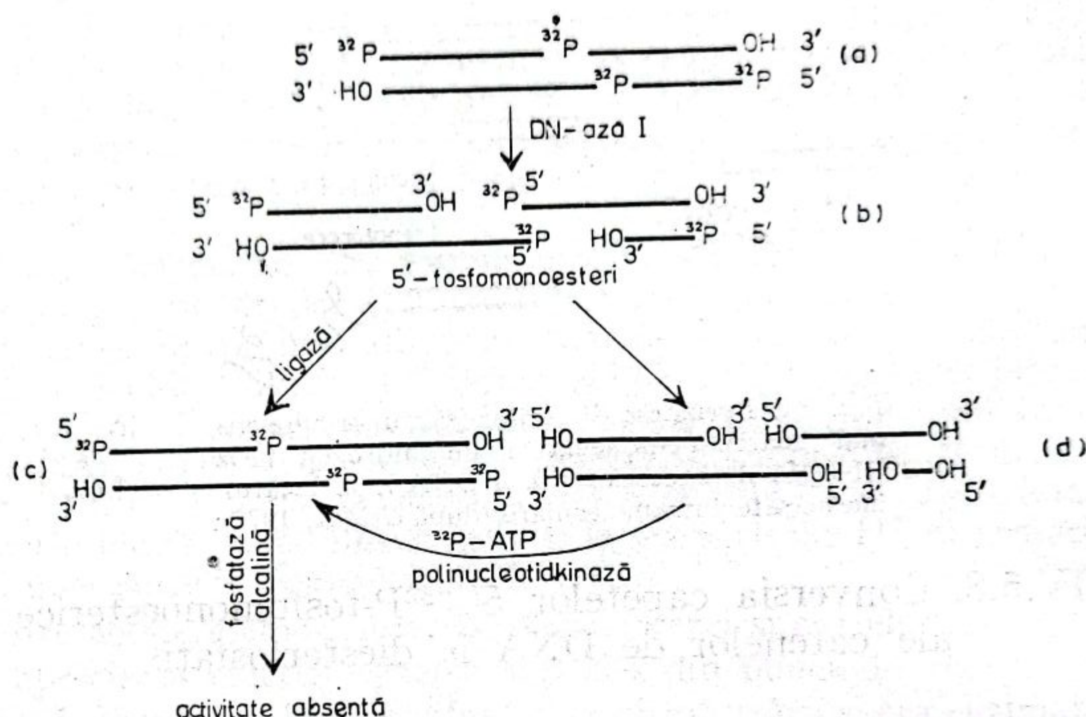


Fig. 32. Schema obținerii prin reacție ligazică a produșilor nesusceptibili (c) la acțiunea fosfatazei alcaline.

Olivera (1971), folosind ca substrat pentru testarea acțiunii ligazei în reacția de conversie un DNA bicatenar sintetic de tip poli (dA). poli (dT) constată că atît viteza reacției, cît și amploarea ei depind de lungimea relativă a celor două catene. Astfel, valorile maxime se ating cu un poli(dA) lung (1000 nucleotide cel puțin) și fragmente relativ scurte de poli(dT) (50—200 nucleotide). Proporția celor doi homopolimeri în duplex trebuie să fie întotdeauna 1 : 1. Scăderea lungimii lanțului poli(dA) sau modificarea raportului dA : dT provoacă întotdeauna o scădere marcată a legării. Reacția nu poate fi folosită pentru testarea acțiunii ligazice dacă se produce inversarea rolurilor: poli(dA) avînd catene scurte și poli(dT) avînd catena lungă, deoarece în acest caz se formează structuri tricatenare, favorizate cinetic de lanțurile mici de poli(dA). Dacă fie dA, fie dT se înlocuiesc cu ribohomopolimerii corespunzători nu se observă activitate de legare.

IV.5.3.2. **Creșterea masei moleculare a lanțurilor polinucleotidice care au participat la reacția ligazică (modificarea coeficientului lor de sedimentare).** Olivera și Lehman (1971) au observat, lucrînd cu polinucleotide sintetice, că lanțurile de poli (dT) scurte la început (cca 150 nucleotide) cresc ca lungime ca rezultat al acțiunii enzimei. Ultracen-

trifugarea în gradient de sucroză în mediu alcalin a arătat că 65% din lanțurile de poli(dT) ating un coeficient de sedimentare de cel puțin două ori mai mare decît poli(dT) reacționate, iar 5% din produsul de reacție sedimentează chiar de 20 de ori mai rapid decît substratul inițial (Weiss și Richardson, 1967).

IV.5.3.3. **Scăderea numărului de capete 5'-fosfat ale substratului, apreciat prin calcularea diferenței între numărul lor la începutul reacției ligazice și numărul lor la terminarea reacției.** Metoda a fost propusă de către Weiss și Richardson (1967) și a fost reluată de Sladkova (1976), care utilizează ca substrat tot DNA de bacteriofag *T7*, dar care calculează de fapt numărul leziunilor reparate, cu capete 5'-fosfat incluse în legături fosfodiesterice și nu capetele 5'-fosfat rămase libere.

IV.5.3.4. **Alte metode.** În afara metodelor de testare a activității DNA ligazice (de reparare a leziunilor cu capete 3'-hidroxil și 5'-fosfat adiacente dintr-o singură catenă a DNA bicatenar) prezentate, în literatura de specialitate se mai întîlnesc numeroase altele, cum ar fi:

— legarea unei catene polinucleotidice la o altă catenă polinucleotidică imobilizată pe o matrice solidă, de exemplu prin esterificarea capătului ei 5'-fosfat cu o grupare hidroxil a unui rest de glucoză din celuloză (Spadari și colab., 1971);

— folosirea ca substrat a acidului polideoxicitidilic marcat cu ^{125}I; sensibilitatea crescută a metodei (de 1000 de ori mai mare) permite scăderea limitei de determinare a activității ligazice sub cea a metodelor curente (Spadari, 1972);

— reducerea numărului situsurilor accesibile unei DNA polimeraze (Karkas, 1974);

— restabilirea activității de transformare a DNA lezat (Ando și Kosawa, 1970; Laipis, 1969) etc.

Majoritatea metodelor sînt, în general, deosebit de laborioase și implică și folosirea altor enzime, cu un înalt grad de puritate, precum și a unor substraturi greu de preparat și care trebuie să aibă o activitate specifică a izotopului cu care sînt marcate suficient de ridicată. De aceea, dacă este nevoie doar de a se obține o dovadă calitativă a activității ligazice, cea mai accesibilă este metoda electroforetică: reacția de legare are loc în condiții standard pentru enzimă, iar produsul rezultat este analizat pe gel de agaroză și pus în evidență în UV, după colorare cu bromură de etidiu.

IV.5.4. Rolul *in vivo* al DNA-ligazelor

Majoritatea cunoștințelor asupra funcției *in vivo* a DNA-ligazelor se datorează studiului unor mutante bacteriene în care enzima este defectivă. Întrucît etapa de legare a unor fragmente de DNA este pre-

zentă în toate modelele de recombinare genetică, în repararea leziunilor moleculare la nivelul DNA, precum și în replicarea DNA, se poate presupune că lipsa ligazei din anumite bacterii va produce o serie de aberații în oricare din aceste procese, ceea ce va înlesni studierea rolu-

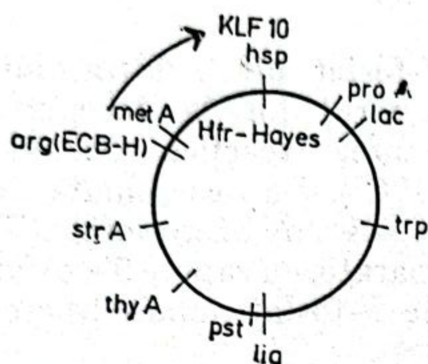


Fig. 33. Localizarea genei structurale pentru DNA-ligază pe harta genetică a *E. coli* (după *Taylor* și *Trotter*, 1967).

lui enzimei. S-au descris numeroși mutanți defectivi, atît în ceea ce privește *E. coli* DNA-ligaza, cît și DNA-ligaza *T*4.

Se cunosc două mutații ale genei structurale pentru ligază, iar ambele sînt situate pe harta genetică a *E. coli* la aproximativ 45 minute (Gottesman și colab., 1973; Taylor și Trotter, 1967) (fig. 33).

Deși extractele celulare ale ambilor mutanți conțin enzime anormale, termosensibile, numai unul dintre mutanți și anume *E. coli ligts7* (Gottesman și colab., 1973) este un mutant condițional letal, care nu supraviețuiește la 42°C, în timp ce mutantul celălalt *lig4* se comportă diferit. Ambii mutanți cultivă normal la 30°C. Diferența între comportările lor s-ar putea datora unei proporții diferite de activitate ligazică reziduală, care să persiste la temperatură ridicată.

Este interesant de văzut care sînt consecințele fiziologice ale acestor mutații. Mutantul *ligts7*, după cum s-a arătat mai sus, nu poate cultiva la 42°C și își pierde viabilitatea atunci cînd este trecut de la temperatura permisivă de 25°C la o temperatură nepermisivă (42°C). Același mutant s-a dovedit a fi deosebit de sensibil la agenții de alchilare, cum ar fi metilmetansulfonatul, sau la acțiunea razelor UV, chiar la temperatura permisivă. Bacteria care a suferit această mutație devine incapabilă să-și repare leziunile provocate la nivelul DNA de către agenții alchilanți mutageni.

Tulpina *ligts7*, după cum se poate presupune, prezintă defecte și la nivelul replicării DNA; lipsa ligazei duce la acumulări mari de fragmente Okazaki (Okazaki și colab., 1968), cu mult peste cele găsite la tulpina sălbatică. Întreaga cantitate de ^{3}H-timidină care se încorporează de către *E. coli ligts7* în cursul unei marcări de scurtă durată (10 secunde) la 42°C se regăsește într-o fracțiune de DNA cu coeficientul de sedimentare 10S. În condiții de creștere similare, tulpina *E. coli lig*$^+$ încorporează ^{3}H-timidina într-un DNA cu coeficient de sedimentare de 24S sau chiar puțin mai mare. Dacă marcarea de scurtă durată (în puls) a *E. coli ligts7* la 42°C este urmată de un tratament de 5 mi-

nute, la 25°C cu un exces de timidină nemarcată, cea mai mare parte a timidinei tritiate încorporate apare într-un DNA cu un coeficient mediu de sedimentare de 30S, ceea ce sugerează că materialul de 10S care se acumulează în mutant la temperatura nepermisivă este un precursor al DNA înalt polimerizat.

Întrucît existența unei DNA-ligaze funcționale este esențială pentru replicarea normală a DNA, precum și pentru repararea unor leziuni care pot apare la nivelul DNA, se pune întrebarea cum se poate explica creșterea normală, cît și viabilitatea mutantului *lig4* la temperaturi la care în extractele brute se găsește doar 1%, sau sub această valoare, activitate ligazică? S-ar putea ca ligaza să fie prezentă în celulă într-o cantitate mult mai mare decît cea de care celula are nevoie în mod normal.

Pe baza masei moleculare de 74 000 a enzimei *E. coli* DNA-ligază s-a făcut estimarea numărului de molecule de DNA ligază per celulă bacteriană, comparîndu-se activitatea enzimei pure cu activitatea determinată în extractele bacteriene brute. S-a constatat astfel că celulele de *E. coli* tulpină sălbatică crescute pe medii îmbogățite, ajung să conțină 200—400 replici de enzimă per celulă, număr apropiat de cel calculat pentru DNA-polimeraza I (Richardson și colab., 1964). Întrucît, la fel ca și DNA-polimeraza, DNA-ligaza acționează în ultima etapă a multiplicării DNA (Okazaki și colab., 1972), s-ar putea ca această asemănare frapantă între concentrațiile celor două enzime să nu fie întîmplătoare, ci să aibă o anumită semnificație legată de replicarea DNA.

Așa după cum s-a arătat anterior, o celulă de *E. coli* conține aproximativ 300 molecule de DNA-ligază (Modrich și colab., 1973). Întrucît turnover-ul enzimei este de 25 min^{-1} la 30°C (Modrich și Lehman, 1973), rezultă că în fiecare minut, într-o celulă pot fi reparate pînă la 7500 de crestături monocatenare ale moleculei de DNA. Deoarece ambele catene ale DNA cromozomal se replică în mod discontinuu (Gottesman și colab., 1973), iar DNA cromozomal de *E. coli* — la 30°C — se replică în aproximativ 65 minute (Bird și Lark, 1970), ținînd cont că lungimea medie a unui fragment Okazaki este de aproximativ 1000 nucleotide (Okazaki și colab., 1972), ar fi de ajuns ca într-o celulă, per minut, să aibă loc 200 de legări pentru ca multiplicarea celulelor să se poată produce.

Bibliografie

1. Ando, T., Kosawa, T., *Biochim, Biophys. Acta* **204**, 257 (1970).
2. Bird, R.E., Lark, K.G., *J. Mol. Biol.* **49**, 343 (1970).
3. Bode, V.C., Kaiser, A.D., *J. Mol. Biol.* **14**, 148 (1965).
4. Cozzarelli, N.R., Melechen, N.E., Jovin, T.M., Kornberg, A., *Biophys. Biochem. Res. Commun.* **28**, 578 (1967).
5. Fareed, G.C., Wilt, E.M., Richardson, C.C., *J. Biol. Chem.* **246**, 925 (1971).
6. Gefter, M.L., Becker, A., Hurwitz, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **58**, 240 (1967).

7. Gellert, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **57**, 148 (1967).
8. Gellert, M., in „*Methods in enzymology*", ed. L. Grossman & K. Moldave, Acad. Press (New York), vol. XXI D, p. 326 (1971).
9. Gottesman, M.M., Hicks, M., Gellert, M., *J. Mol. Biol.* **77**, 531 (1973).
10. Gumport, R.I., Lehman, I.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **68**, 2559 (1971).
11. Gupta, N.N., Ohtsuka, E., Weber, H., Chang, S.H., Khorana, G.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **60**, 285 (1968).
12. Hall, Z.W., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.* **244**, 43 (1969).
13. Harvey, C.L., Gabriel, T.F., Wilt, E.M., Richardson, C.C., *J. Biol. Chem.* **246**, 4523 (1971).
14. Howell, S.H., Stern, H., *J. Mol. Biol.* **55**, 357 (1971).
15. Jackson, D.A., Symonds, R., Berg, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **69**, 2904 (1972).
16. Karkas, J.D., *Biochim. Biophys. Acta* **340**, 452 (1974).
17. Kellenberg, G.M., Zichichi, M.L., Weigle, J.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **47**, 869 (1961).
18. Kleppe, K., van de Sande, J.H., Khorana, G.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **67**, 68 (1970).
19. Laipis, P.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **62**, 269 (1969).
20. Lehman, I.R., *Science* **186**, 790 (1974).
21. Lehman, I.R., in „*The enzymes*", ed. P. Boyer, Acad. Press (New York), vol. X, p. 237 (1974).
22. Lindhal, T., in „*Methods in enzymology*", ed. L. Grossman & K. Moldave, Acad. Press (New York), vol. XXI D, p. 333 (1971).
23. Lindhal, T., Edelman, G.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **61**, 680 (1968).
24. Lobban, P., Kaiser, A.D., *J. Mol. Biol.*, **78**, 453 (1973).
25. London, J., Knight, M., *J. Gen. Microbiol.*, **44**, 241 (1966)
26. Meselson, M., Weigle, J.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **47**, 857 (1961).
27. Mizutani, S., Temin, H., Nasahiko K., Robert W., *Nature New Biol.*, **230**, 232 (1971).
28. Modrich, P., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.*, **245**, 3626 (1970).
29. Modrich, P., Lehman, I.R., *Fed. Proc.*, **31**, 441 (1972).
30. Modrich, P., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.*, **248**, 7502 (1973).
31. Modrich, P., Anraku, P., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.*, **248**, 7495 (1973).
32. Modrich, P., Lehman, I.R., Wang, J.C., *J. Biol. Chem.*, **247**, 6370 (1972).
33. Moore, S.K., James, E., *Analyt. Biochem.*, **75**, 545 (1976).
34. Olivera, B.M., in „*Methods in enzymology*", ed. L. Grossman & K. Moldave, Acad. Press (New York), vol. XXI D, p. 311 (1971).
35. Olivera, B.M., Hall, Z.W., Lehman, I.R., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (U.S.A.), **61**, 237 (1968).
36. Olivera, B.M., Lehman, I.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **57**, 1462 (1967a).
37. Olivera, B.M., Lehman, I.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **57**, 1700 (1967b)
38. Olivera, B.M., Lehman, I.R., *J. Mol. Biol.*, **36**, 261 (1968).
39. Olivera, B.M., Scheffer, D., Lehman, I.R., *J. Mol. Biol.*, **36**, 275 (1968).
40. Okazaki, R., Arisawa, M., Sugino, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **69**, 2954 (1972).
41. Okazaki, R., Okazaki, T., Sakabe, K., Sugimoto, K., Sugino, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **59**, 598 (1968).
42. Panasenko, S.M., Alazard, R.D., Lehman, I.R., *J. Biol. Chem.*, **253**, 4590 (1978).
43. Panasenko, S.M., Cameron, J.R., Davies, R.W., Lehman, I.R., *Science*, **196**, 188 (1977).
44. Panet, A., van de Sande, J.H., Loewen, P.C., Khorana, G.H., Raae A.J., Lillehaug J.R., Kleppe K.: *Biochemistry*, **12**, 5045 (1973).
45. Reiser, J., Bentley, C.M., Yuan, R., *Analyt. Biochem.*, **75**, 555 (1976).
46. Richardson, C.C., Schildkraut, C.L., Aposhian H.V., Kornberg A., *J. Biol. Chem.*, **239**, 222 (1964).
47. Sgaramella, V., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **69**, 3389 (1972).

48. Sgaramella, V., Bursztyn-Pettergrew, H., Ehrlich, D.S., în *„Recombinant molecules: impact on science and society"*, 10-th Miles Internat. Symp., ed. R.F. Beers & E.G. Basset, Raven Press (New York), p. 57 (1977).
49. Sgaramella, V., Ehrlich, S.D., *Eur. J. Biochem.*, **86**, 531 (1978).
50. Sgaramella, V., van de Sande, J.H., Khorana, G.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **67**, 1468 (1970).
51. Silber, R., Malathi, V.G., Hurwitz, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **69**, 3009 (1972).
52. Sladkova, N.I., *Bioorg. Himiia*, **2**, 822 (1976).
53. Spadari, S., *Analyt. Biochem.*, **63**, 380 (1972).
54. Spadari, S., Ciarrochi, G., Falaschi, A., *Eur. J. Biochem.*, **22**, 1. (1971).
55. Taylor, A.L., Trotter, C.D., *Bacteriol. Rev.*, **31**, 332 (1967).
56. Tsukada, K., Ichimura, M., *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **42**, 1156 (1971).
57. Young, E.T., Sinsheimer, R.L., *J. Mol. Biol.*, **10**, 562 (1964).
58. Wang, J.C., *J. Mol. Biol.*, **55**, 523 (1971).
59. Weiss, B., în *„Methods in enzymology"*, ed. L. Grossman & K. Moldave, Acad. Press (New York), vol. XXI D, p. 319 (1971).
60. Weiss B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C., Richardson, C.C., *J. Biol. Chem.*, **243**, 4543 (1968).
61. Weiss, B., Richardson, C.C., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **57**, 1021 (1967).
62. Weiss, B., Thompson, A., Richardson, C.C., *J. Biol. Chem.*, **243**, 4556 (1968).
63. Zimmerman, S.B., Little, J.W., Oshinsky C.K., Gellert, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **57**, 1841 (1967).
64. Zimmerman, S.B., Oshinsky, C.K., *J. Biol. Chem.*, **244**, 4689 (1969).

V. Vehicule (vectori)

Aşa cum s-a arătat un *vehicul* sau un *vector* este o moleculă de DNA care are proprietatea de a se replica independent de cromozomul celular, proprietate pe care şi-o păstrează şi atunci cînd în molecula sa se introduce în mod artificial un fragment de DNA străin (v. cap. „Pasagerii"), purtător al unei informaţii genetice noi. Este de notat că inserţia fragmentului de DNA în vehicul trebuie astfel realizată încît funcţiile esenţiale ale vehiculului, necesare replicării lui, să nu fie deranjate.

Pentru a se putea replica, un vehicul are nevoie de două elemente principale şi anume: a) o regiune din molecula de DNA, echivalentă originii replicării DNA (notată prescurtat *ori*) care să fie recunoscută de către o proteină cu funcţie de iniţiator şi b) să conţină gena pentru această proteină în aceeaşi moleculă (Boyer şi colab., 1977). Aceiaşi autori definesc astfel caracteristicile principale ale unui vehicul ideal:

— să fie uşor de purificat şi să existe în cantităţi suficiente pentru experimentare;

— să posede markeri genetici asociaţi moleculei lor, bine caracterizaţi, care să permită o uşoară selecţionare a celulelor purtătoare a acestor vehicule;

— să posede un număr limitat de situsuri pentru enzimele de restricţie, care să ofere posibilitatea scindării specifice a vehiculului, în scopul ataşării de el a unor fragmente noi de DNA.

Odată ce un vehicul posedă cele două elemente principale arătate mai sus, el îndeplineşte condiţiile postulate de Jacob şi colab. (1963) pentru un *replicon*, deci el se poate autoreplica. Funcţia de vehicul sau de replicon o pot ocupa atît plasmidele bacteriene, cît şi unele virusuri. În principiu, orice plasmidă sau, cum precizează Nathans (1977), orice acid nucleic viral care este infectant poate fi folosit ca vehicul. Totuşi, în practică s-au introdus numai anumite plasmide şi acizi nucleici virali, cum sînt plasmidele colicinogene (*Col* E_1), colifagul λ şi virusul SV40. Preferinţa pentru aceste vehicule a fost dictată de cunoaşterea detaliată

a mapei lor fizice, fapt care facilitează folosirea lor pentru construirea de molecule de recombinanţi.

Plasmidele şi colifagul λ au marele avantaj de a se replica în celulele bacteriene, care — aşa cum se cunoaşte — au o rată rapidă de multiplicare. De aici rezultă posibilitatea multiplicării avantajoase a vehiculului, purtător al informaţiei genetice noi, fapt esenţial pentru producerea pe scară industrială a unui anumit produs biologic codificat de pasager. Aceasta deoarece pasagerul introdus în vehicul — indiferent de natura lui — ajunge sub controlul vehiculului care îl replică şi îl exprimă ca o parte integrantă a moleculei sale. Rezultă că o plasmidă bacteriană, de exemplu, poate să multiplice şi să exprime gena pentru insulină într-o cultură bacteriană, dacă în plasmida respectivă a fost introdusă gena insulinei. Acesta este principiul pe care se bazează obţinerea unor produşi biologic activi importanţi prin tehnologia DNA recombinant.

Referitor la virusul SV40, precizăm că acidul său nucleic are proprietatea de a se integra în DNA celular. În consecinţă, el va putea fi folosit în viitorul apropiat ca vehicul pentru inserţia de gene în cromozomul celulelor de mamifere (Nathans, 1977). Ca atare, el ar putea deveni un agent eficient pentru tratamentul unor maladii care au la bază tulburări metabolice datorate unor defecte genetice; ataşarea de acest vehicul (lipsit însă de zona moleculară care induce transformarea celulară!) a genelor deficiente din genomul organismului bolnavilor respectivi şi integrarea lui în genom ar putea deschide calea terapiei genice.

S-a amintit mai sus că DNA din virusul SV40 are o parte din molecula sa responsabilă de transformarea celulară şi că această parte trebuie modificată în moleculă în momentul în care se pune problema utilizării lui ca vehicul pentru inserţia de gene în genomul celular. S-a ajuns astfel la o situaţie mai generală şi anume la pregătirea sau construcţia vehiculului ideal pentru cercetările de tehnologie cu DNA recombinant.

Construcţia unui vehicul ideal trebuie să ţină cont de două condiţii esenţiale şi anume: a) să se elimine din vehicul toate părţile neesenţiale sau generatoare de efecte nedorite, astfel încît proprietăţile sale de replicare să nu fie afectate şi b) replicarea lui să fie dependentă de anumite condiţii experimentale de creştere a celulelor în care se replică. Dacă prima condiţie are justificarea menţionată, a doua necesită unele precizări. După cum se ştie, construcţia unui vehicul se face în scopul multiplicării unei anumite informaţii genetice pe care în mod natural plasmida sau virusul nu o posedă iniţial. Cum un vehicul poate multiplica orice fragment de DNA străin ataşat de el, aceasta înseamnă că şi inserţia — chiar întîmplătoare — în vehicul a unei informaţii genetice nedorite să fie urmată atît de multiplicarea, cît şi de diseminarea ei. Or, pentru a avea vehiculul sub controlul cercetătorului, el este astfel construit ca multiplicarea lui să se facă numai în condiţii speciale de laborator.

Este deci vorba aici de o măsură de securitate pentru a împiedica biohazardul.

În continuare vor fi descrise caracteristicile principale ale vehiculelor utilizate în tehnologia DNA recombinant.

V.1. Elemente extracromozomale. Plasmide bacteriene

În anul 1959, Ochiai și Akibe — în mod independent unul de altul — au raportat, în Japonia, un fenomen necunoscut pînă atunci și anume rezistența multiplă a bacteriilor enterice la medicamente (antibiotice), proprietate care poate fi transferată *in vitro* la bacterii susceptibile la medicamente. Investigarea acestui fenomen a pus în evidență existența în unele bacterii a unor *factori transmisibili de rezistență la medicamente* sau pe scurt *factori R* (Watanabe, 1963). Ulterior atît factorii *R*, cît și factorii de sex *F*, precum și alte componente bacteriene care nu sînt sub controlul genetic al cromozomilor au primit denumirea generală de *plasmide* sau *elemente extracromozomale*. Caracteristica esențială și comună a tuturor plasmidelor este capacitatea lor de propagare proprie, ca atare sau împreună cu oricare genă legată de ele. Clowes (1972) definește astfel o plasmidă: „un element care este separat fizic de cromozomul celular și este capabil de a se perpetua stabil în această stare". Termenul de element extracromozomal este sinonim cu acela de plasmidă. El poate fi definit și ca un element neesențial pentru creșterea celulelor normale, putînd fi pierdut sau cîștigat de celule fără efect letal. Acele plasmide care au proprietatea de a ocupa un loc în cromozom se numesc *epizomi*. În timp ce o plasmidă poate sau nu poate fi un epizom, toți epizomii sînt plasmide. Întrucît definiția de epizom implică o relație genetică între plasmidă și celulele-gazdă, același element poate fi un epizom într-o celulă-gazdă și plasmidă într-o altă celulă.

Este important de precizat că cele mai multe gene ale plasmidelor par să nu aibă echivalenți cromozomali, de unde rezultă necesitatea evidentă de a face deosebirea între genele plasmidelor și ale cromozomilor, care uneori pot fi similare fenotipic, dar sînt total distincte din punct de vedere funcțional.

V.1.1. Clasificarea plasmidelor

Pe baza proprietăților biologice pe care le prezintă, Cohen (1976) împarte plasmidele în nouă categorii, cu următoarele caracteristici:

1) prezintă abilitatea de a transfera material genetic prin conjugare ..... F, R_1, Col_1

2) produc bacteriocine ....*ColDF 13 (Enterobacterium cloacae), Col_I*

3) produc antibiotice,.....................*SPC1* (plasmida din *Str. coelicolor)*

4) produc rezistență la metale grele (Cu^{2+}, Hg^{2+}) ....*pI258 (S. aureus), R_6*

5) produc rezistență la ultraviolete ..... *Col Ib, R_{46}*

6) produc enterotoxine ....*Enterobacteriaceae*

7) determină factorul de virulență (antigen hemolizină K_{88}) ....*Col V, Hly*

8) produc tumorigenicitate la plante ....plasmida *T1 (Agrobacterium tumefaciens)*

9) determină restricție și modificare ....producția de nuclează Eco *RI* și metilază (plasmida din *E. coli RY13*)

În ciuda diversității lor, s-au făcut unele generalizări privind clasificarea plasmidelor. Astfel, plasmidele au fost grupate în două tipuri majore: conjugative și neconjugative.

V.1.1.1. **Plasmide conjugative.** Se spune că o plasmidă este conjugativă sau este clasificată ca factor de sex dacă este autotransmisibilă de la o celulă bacteriană la alta *(conjugare)*. Prezența plasmidelor de acest tip conferă proprietatea de donor celulelor care le posedă. Aceste celule donatoare sînt capabile să transfere plasmide sau alte informații genetice celulelor receptoare.

În general, plasmidele conjugative au masa moleculară mare, de aproximativ $40-70 \times 10^6$ daltoni, dar mărimea lor este de obicei cuprinsă în domeniul $17-200 \times 10^6$ daltoni.

Plasmidele conjugative se împart, la rîndul lor, în două categorii: *represate* și *derepresate*, pentru fertilitate. S-a stabilit că marea majoritate a plasmidelor existente în natură sînt represate, ceea ce înseamnă că acestea permit celulelor să transfere plasmida în proporție de numai 0,01%—1% din timp, în condițiile optime de laborator. În schimb, plasmidele derepresate permit tuturor celulelor donatoare să transfere plasmida.

V.1.1.2. **Plasmide neconjugative.** Aceste plasmide nu au capacitatea de a promova conjugarea. Dimensiunea lor este mică, cuprinsă între $0,5-15 \times 10^6$ daltoni. Se găsesc în copii multiple per celulă. Dacă o plasmidă conjugativă este corezidentă cu o plasmidă neconjugativă, plasmida mai mică (deci cea neconjugativă) poate fi transferată (mobilizată) la o celulă receptoare în timpul conjugării.

Este important de reținut că numai plasmidele neconjugative pot fi întrebuințate pentru introducerea DNA străin în *E. coli K12*. Dintre

plasmidele care au primit avizul pentru a fi folosite ca vehicule în celulele-gazdă *EK1* sau *EK2* (χ *1776*) amintim plasmidele *pMB9*, *pBR313*, *pBR322* și *pSC101* (v. pag. 130). Aceste plasmide au caracteristica comună de a fi transferate (mobilizate) cu o frecvență foarte scăzută în condiții nepermisive de laborator, ceea ce conferă un grad crescut de protecție biologică pentru experimentele de tehnologie a DNA recombinant.

V.1.2. Compoziția fizică a plasmidelor

În 1961 Marmur și colab. aduc prima dovadă directă a naturii fizice a plasmidelor bacteriene. Autorii au transferat activitatea de fermentare a lactozei asociată cu factorul *F'* (*F' lac*$^+$) de la o tulpină de *E. coli* la o tulpină de *Serratia marcescens* și au analizat DNA al tulpinii acceptoare. Ultracentrifugarea analitică în gradient de densitate de CsCl a arătat prezența unui vîrf de DNA caracteristic cromozomului tulpinii *S. marcescens* ($\rho = 1{,}718$ g/cm^3) și, ceea ce a fost surprinzător, un umăr corespunzător DNA din *E. coli* ($\rho = 1{,}709$ g/cm^3). Trebuie precizat că umărul nu a fost observat niciodată în tulpina parentală de *S. marcescens*, înaintea transferului de factor *F*.

Ulterior, Falkow și colab. (1964) au transferat factorul *F'lac*$^+$ la o tulpină de *Proteus*. Prezența factorului a fost urmărită, alături de alte teste, și prin analiza DNA izolat din *Proteus* înainte și după transfer, precum și după un tratament considerat clasic prin care factorul *F'*

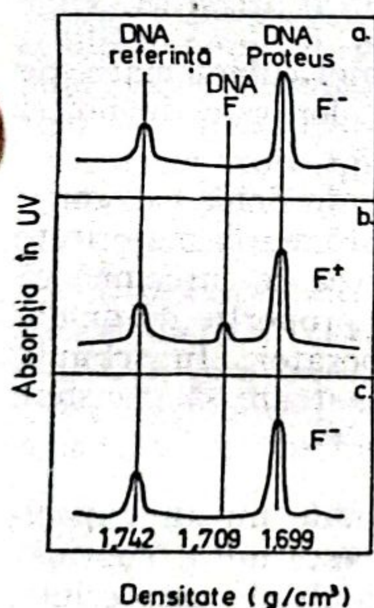


Fig. 34. Prezentarea grafică a profilelor de densitate a DNA din *Proteus* înainte (a) și după (b) transferul factorului *F'lac*$^+$, precum și a DNA din *Proteus* „vindecat" de factorul *F'* prin tratamentul cu acridinoranj (c). Pentru o bună identificare a benzilor de DNA, analiza a mai conținut și un DNA de referință cu o densitate mare ($\rho = 1{,}742$ g/cm^3) (după *Falkow* și colab., 1964).

a fost „vindecat" sau înlăturat cu ajutorul acridinoranjului. Figura 34 prezintă rezultatul analizei DNA: comportarea DNA din *Proteus* ($\rho = 1{,}699$ g/cm^3) în absența factorului *F'* și în prezența unui DNA de referință (DNA din *Bacillus subtilis* care are densitatea $\rho = 1{,}742$ g/cm^3) (fig. 34, *a*) și comportarea DNA din tulpina de *Proteus* căreia i s-a trans-

ferat factorul F' (fig. 34, *b*). Așa cum rezultă din figură, DNA conține un vîrf satelit separat, corespunzător factorului F', la densitatea de 1,709 g/cm³. Este important de remarcat că vîrful satelit nu a mai fost prezent atunci cînd factorul F' a fost „vindecat" de către acridinoranj (fig. 34, *c*). Aceste cercetări au fundamentat ideea că factorul F' este constituit din DNA, idee care s-a generalizat apoi pentru toate plasmidele.

V.1.3. Masele moleculare ale DNA plasmidic

Inițial, estimarea maselor moleculare ale DNA plasmidic s-a făcut pe preparate obținute prin metoda lui Marmur (1961). Condițiile oarecum drastice impuse de metodă, prin care se îndepărtează proteinele din DNA, determină însă fragmentarea moleculei de DNA în segmente cu masa moleculară de aproximativ 10×10^6 daltoni. Odată cu introducerea unor metode mai blînde de extracție a DNA — cum a fost aceea preconizată de Hickson și colab. (1967) — s-a constatat că masele moleculare ale DNA plasmidic sînt uneori chiar mai mari decît 100×10^6 daltoni. În esență, metoda aceasta constă în obținerea mai întîi a sferoplastelor, prin tratarea bacteriilor cu un amestec de lizozim, RN-ază și EDTA, în prezența sucrozei, urmată de tratamentul acestora cu un detergent de tipul DDS, pentru a produce liza celulară. În etapa finală a purificării, proteinele sînt îndepărtate prin tratamentul cu fenol tamponat, iar fenolul se elimină prin dializă.

Estimarea maselor moleculare ale DNA plasmidic se face, în principal, prin trei procedee: unul bazat pe constantele de sedimentare stabilite prin ultracentrifugare, al doilea pe determinările lungimii de contur a moleculei de DNA, efectuate cu microscopul electronic, iar al treilea prin determinarea mobilității electroforetice în gel de agaroză.

În primul caz, constantele de sedimentare se raportează la un DNA standard, care în cele mai multe cazuri este DNA din fagul λ, avînd masa moleculară de 30,8 Mdal (megadaltoni; 1 Mdal = 10^6 dal). În al doilea procedeu, masa moleculară se estimează din relația stabilită de Lang (1970) pentru DNA bicatenar, conform căreia 1 nm = 2,07 Mdal. În ceea ce privește al treilea procedeu, care în ultimul timp a devenit cel mai folosit, el permite determinarea masei moleculare relative în raport cu molecule standard, aflate în aceeași conformație.

Datele actuale permit a se preciza că plasmidele au dimensiuni variabile, între 2 250 de nucleotide (masă moleculară de aproximativ 1,3 Mdal), dimensiune descrisă pentru plasmida minicirculară „criptică" a bacteriei *E. coli 15* (Cozzarelli și colab., 1968) și 400 000 de perechi de nucleotide (masă moleculară de aproximativ 240 Mdal), dimensiunea pe care o ating plasmidele mai complexe ale factorilor de sex F' (Cohen, 1976). Valoarea dată de Cohen pare însă a fi excesiv de mare, dacă

se ține cont de tabelele publicate de Clowes (1972) pentru masele moleculare ale factorilor de sex F' în care cifrele variază între 35 și 75 Mdal. În tabelul 13 sînt redate masele moleculare ale unor plasmide.

Tabelul 13

Masele moleculare ale unor plasmide

Plasmida		Masa moleculară (Mdal)	Referința
Factori de sex (F și F')	F	42	Freifelder (1968)
	F'-*gal*	48	Freifelder (1968)
	F'-*lac*	69	Freifelder (1968)
Factori colicinogeni (*Col*)	*Col* E_1	4,8	Roth și Helinski (1967)
	Col E_2	6,0	Bazaral și Helinski (1968)
	Col E_3	6,0	Bazaral și Helinski (1968)
	FVBtct	113	Hickson și colab. (1968)
Factori de rezistență (R)	R_{15}	46	Nisoka și colab. (1970)
	$222/R_4$	70	Nisoka și colab. (1970)
	$222/R_3w$	69	Nisoka și colab. (1970)
	R_1	59	Cohen și Miller (1964)

Precizăm că tabelul nu conține masele moleculare ale plasmidelor special construite pentru cercetările de tehnologie a DNA recombinant.

V.1.4. Conformațiile moleculare ale DNA plasmidic

În mod oarecum surprinzător, conformațiile moleculelor de DNA plasmidic sînt asemănătoare celor pe care le prezintă virusurile oncogene DNA: polioma, papiloma și SV40.

În mediu neutru, o primă conformație moleculară descrisă pentru DNA plasmidic este aceea de moleculă bicatenară circulară covalent închisă *(CCI)* sau, în termenii consacrați în literatură *covalently closed circular duplex molecule* (*CCC*). Caracteristic pentru această conformație este faptul că atunci cînd este izolată din celulă ea își asumă o formă „superîncolăcită" *(supercoil)*, adică elicea dublă a DNA se răsucește suplimentar în jurul ei însăși. La această moleculă ambele catene sînt continui, fiind închise covalent (v. fig. 35,*c*).

A doua conformație pe care o poate avea o moleculă de DNA plasmidic este aceea de „duplex circular deschis" (*CD*) *(open circular duplex)* (*OC*). În acest caz molecula este circulară, avînd o catenă continuă, iar a doua discontinuă. Datorită discontinuității uneia din catene ea se mai numește și „cerc crestat" *(nicked circle)* În această conformație molecula de DNA nu se mai superîncolăcește, motiv pentru care se numește și „relaxată" (fig. 35, *b*).

Prin scindarea (crestarea) catenei continui a moleculei de duplex circular deschis ea trece în cea de a treia conformație pe care o poate

avea molecula de DNA plasmidic şi anume aceea de „duplex liniar" (fig. 35, *a*).

În mediu alcalin, cînd toate legăturile de hidrogen dintre baze se rup şi catenele se desfac, moleculele *CCI* trec într-o conformaţie compactă, avînd coeficientul de sedimentare relativ (faţă de duplexul

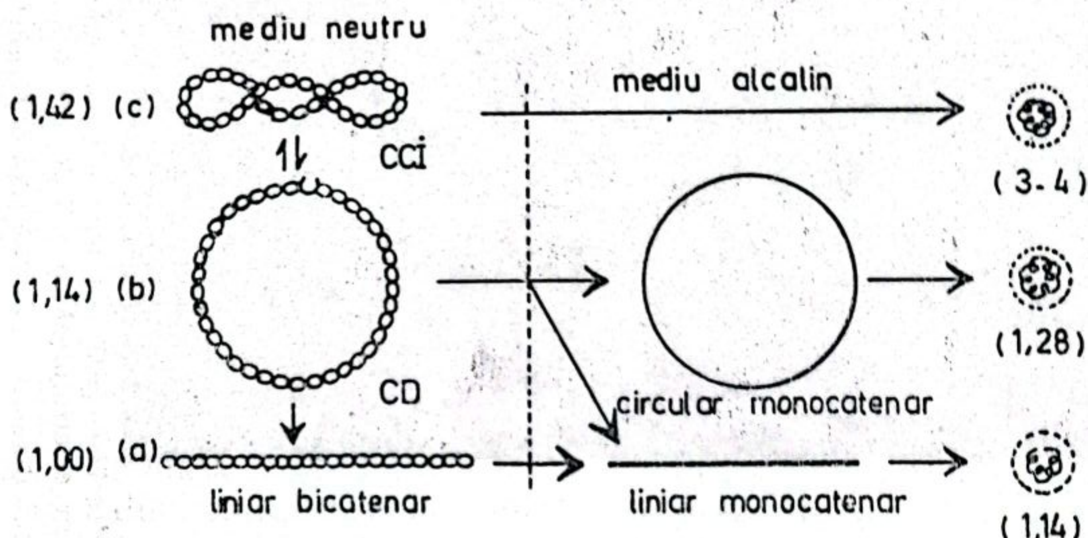


Fig. 35. Diferite conformaţii moleculare pe care le pot avea moleculele de DNA plasmidic sau DNA din virusurile oncogene SV40, polioma şi papiloma în mediu neutru sau alcalin. În paranteză sînt prezentaţi coeficienţii de sedimentare relativi raportaţi la cel al moleculei de DNA bicatenar (duplex) liniar luat ca referinţă.

liniar, considerat etalon) crescut de 3—4 ori. Cele două catene ale moleculelor *CCI* fiind întrepătrunse nu se separă. În acelaşi mediu, moleculele duplex circulare deschise se denaturează, iar cele două catene ale sale se despart, una dă naştere la un cerc monocatenar cu catena continuă, avînd coeficientul de sedimentare relativ de 1,28, iar a doua devine moleculă monocatenară liniară avînd coeficientul de sedimentare relativ de 1,14.

Sub influenţa alcaliilor, duplexul liniar se desface în cele două catene liniare avînd coeficientul de sedimentare relativ de 1,14.

Trecerile pe care le suferă conformaţiile DNA plasmidic în mediu neutru şi alcalin sînt reprezentate schematic în fig. 35.

Din examinarea fig. 35 rezultă clar că atunci cînd se supun ultracentrifugării moleculele de DNA plasmidic, conformaţiile lor pot fi uşor recunoscute după coeficientul de sedimentare caracteristic pe care îl prezintă. Moleculele care sedimentează cel mai rapid sînt cele aflate în conformaţia *CCI*, urmează apoi în ordine cele în conformaţie de cerc deschis, iar ultimele sedimentează moleculele liniare.

Cele trei conformaţii pot fi identificate rapid prin metoda electroforezei în gel de agaroză: moleculele *CCI* au mobilitatea electroforetică cea mai mare, iar moleculele *CD* — mobilitatea cea mai mică, formele liniare avînd o mobilitate intermediară (fig. 36). Trecerea moleculelor

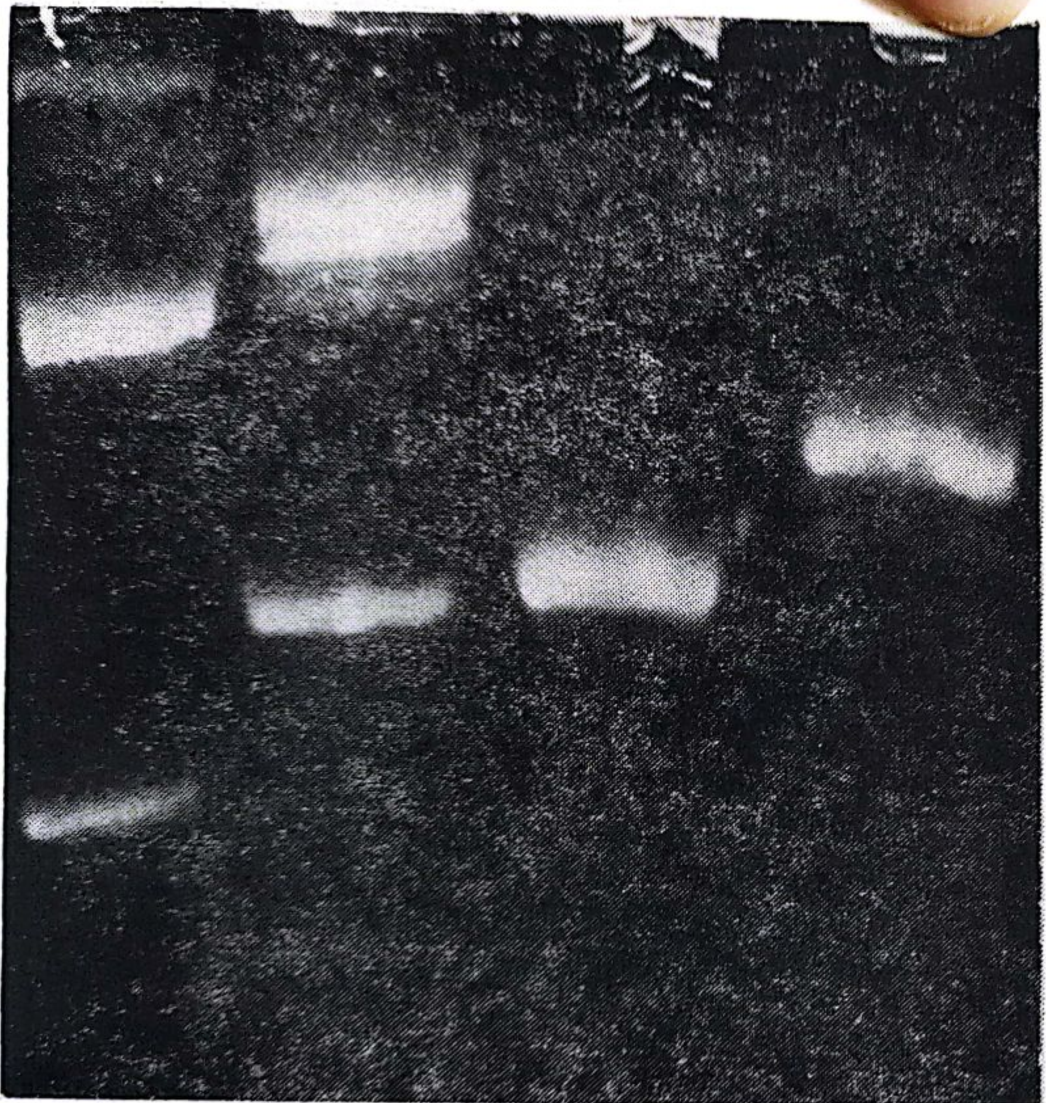


Fig. 36. Electroforeza moleculelor circulare covalent închise (*CCI*), circulare deschise (*CD*) și liniare ale plasmidelor *pBR313*, *pSF2124*, precum și a DNA din virusul SV40, puse în evidență prin electroforeză în gel de agaroză.

A) Coloana 1-a conține: DNA *CCI* (spotul de jos), DNA *CD* (spotul de sus) ale plasmidei *pBR313*. Coloana a 2-a conține: DNA *CCI* (spotul de jos) și DNA *CD* (spotul heterogen) ale plasmidei *pSF2124*. Coloana a 3-a conține DNA liniar al plasmidei *pBR313*, iar coloana a 4-a DNA liniar al plasmidei *pSF2124*. Formele liniare ale celor două plasmide s-au obținut prin incubarea DNA *CCI* + *CD* (din materialul caracterizat în coloanele 1 și 2) cu enzima de restricție Eco *RI*. Precizăm că ambele plasmide conțin un situs pentru Eco *RI*.

B) Cele trei conformații moleculare ale DNA extras din virusul SV40. Coloana 1-a prezintă conformația *CCI* (spotul de jos) și conformația *CD* (spotul de sus). Coloana a 2-a arată conversia celor două conformații moleculare în conformația liniară de către enzima de restricție Eco *RI* (după *Popa* și colab., 1981).

din conformaţia *CCI* (şi *CD*) în cea liniară se face de obicei cu ajutorul enzimelor de restricţie, cu condiţia ca molecula de DNA în conformaţie *CCI* să aibă un singur situs pentru enzima respectivă.

V.1.5. Calculul coeficienţilor de sedimentare a diferitelor conformaţii de DNA

Pentru moleculele de DNA aflate în aceeaşi conformaţie moleculară coeficienţii de sedimentare (exprimaţi în unităţi Svedberg) se calculează din masele lor moleculare, cu ajutorul unor formule empirice, cum se va arăta în continuare.

Pentru moleculele de DNA aflate în conformaţie de duplex liniar coeficientul de sedimentare (S) se deduce din formula:

$S^0_{20,w} = 2,8 + 0,00834\ M^{0,47}$ (Freifelder, 1970)

în care M este masa moleculară a DNA.

În cazul duplexului circular deschis formula devine:

$S^0_{20,w} = 2,7 + 0,0175\ M^{0,445}$ (Hudson şi colab. 1968)

iar pentru duplexul circular covalent închis:

$S^0_{20,w} = 7,44 + 0,00243 M^{0,58}$ (Hudson şi colab. 1968).

Calculînd raportul coeficienţilor de sedimentare a DNA aflat în diferite forme conformaţionale în funcţie de masele lor moleculare, Freifelder (1970) a constatat că acesta variază după anumite curbe specifice (fig. 37).

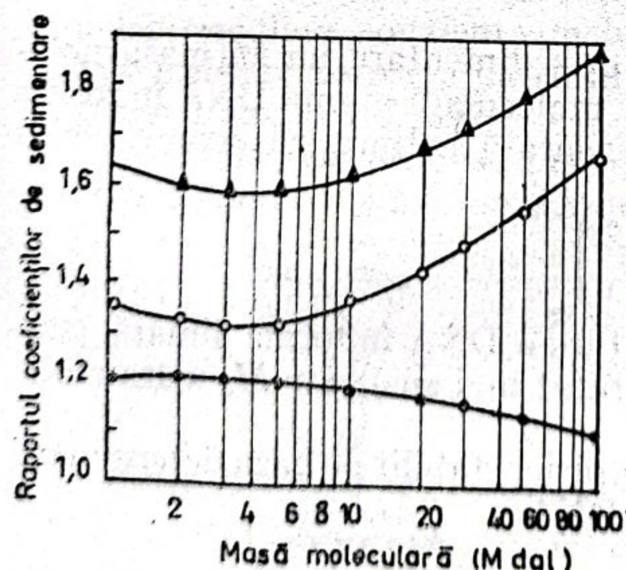


Fig. 37. Variaţia raportului coeficienţilor de sedimentare a moleculelor de DNA aflate în diferite conformaţii moleculare în funcţie de masele lor moleculare (după *Freifelder*, 1970).

Valoarea absolută a coeficientului de sedimentare a unui DNA aflat în conformaţie de cerc deschis (*CD*) sau cerc covalent închis (*CCI*) poate fi determinată printr-o cosedimentare a DNA, respectiv cu un DNA standard, aplicîndu-se cunoscuta formulă:

$$S_1/S_2 = D_1/D_2$$

în care S_1 și S_2 sînt coeficienții de sedimentare, iar D_1 și D_2 distanțele pe care le parcurg în cîmpul centrifugal de la menisc DNA standard și DNA al cărui coeficient de sedimentare urmează să fie determinat.

Pentru exemplificare, în fig. 38 se prezintă aspectul general al unei analize de ultracentrifugare în care s-a cosedimentat un amestec de DNA

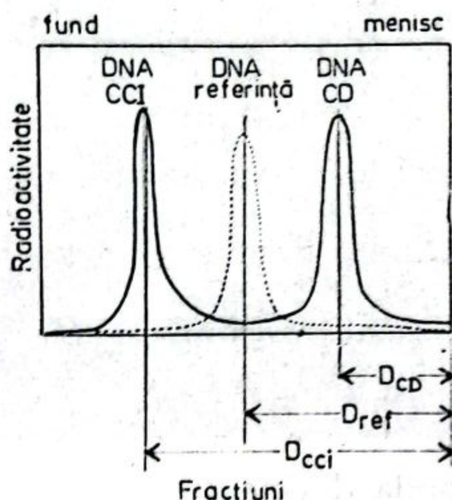


Fig. 38. Comportarea moleculelor *CCI* și *CD* în cursul ultracentrifugării (după *Clowes*, 1972).

conținînd molecule *CCI* și *CD* (avînd coeficienții de sedimentare necunoscuți) împreună cu un DNA standard.

Coeficientul de sedimentare al formei liniare a unui DNA (S_3) se poate stabili aproximativ prin divizarea valorii lui S_1 prin valoarea rezultată din raportul *CD*: liniar, corespunzătoare masei moleculare aproximative stabilite în fig. 38.

Calculul masei moleculare a unui DNA în conformația de duplex liniar se face după cum urmează.

Considerînd că S_2 este coeficientul de sedimentare, iar M_2 masa moleculară a unui DNA de referință, masa moleculară a unui DNA în formă liniară poate fi estimată din formula prezentată de Burgi și Hershey (1963):

$$\frac{S_2}{S_3} = \left(\frac{M_2}{M_1}\right)^{0,38}$$

în care S_3 este coeficientul de sedimentare a DNA în formă liniară (stabilit prin aproximație după cum s-a arătat mai sus), iar M_3 masa moleculară a DNA liniar.

Exponentul 0,38 este un număr empiric, stabilit pe baza determinării maselor moleculare (M) a mai mulți DNA.

V.1.6. Replicarea DNA plasmidic

De la început trebuie precizat că în momentul de față nu există un mecanism general valabil pentru replicarea tuturor tipurilor de plasmide. Mecanismele propuse se bazează pe observațiile experimentale

obținute pe anumite tipuri de plasmide. Ca atare, aceste modele trebuie luate în considerare specific numai pentru plasmidele respective, pînă cînd se vor aduna și alte date experimentale care să asigure generalizarea lor.

Cele mai multe modele de replicare a plasmidelor își au originea în primul model propus de Jacob și colab., 1963. Multe din aspectele acestui model au fost eliminate, dar ideile sale de bază rămîn încă valabile. Pentru moleculele de DNA circulare, capabile a se autoreplica (cazul plasmidelor), se presupune că există două situsuri care controlează replicarea lor. Un situs este reprezentat de gena reglatoare, care produce o substanță difuzabilă denumită „inițiator". Aceasta acționează asupra celui de al doilea situs denumit „operatorul" replicării sau pe scurt „replicator", care determină inițierea replicării din locul său.

Pentru a explica replicarea și moștenirea stabilă a proprietăților plasmidelor de tip *F*, de exemplu, s-a presupus că repliconul acestei plasmide se atașează de un loc al celulei de care se atașează și cromozomul. S-a sugerat că acest loc de atașare este situat pe membrana celulară, care controlează semnalul de inițiere a replicării atît pentru cromozom, cît și pentru plasmidă.

În timpul fiecărei generații celulare, locul de pe membrană împreună cu plasmidele atașate se duplică astfel încît la diviziunea celulară se produce o copie a locului de pe membrană împreună cu plasmida(ele) și cromozomul(mii) atașat la fiecare celulă-fiică. Astfel se asigură moștenirea stabilă a tuturor caracterelor celulare, controlate atît de plasmide, cît și de cromozomi (Clowes, 1972).

În ultimul timp, atenția cercetătorilor care studiază replicarea moleculelor circulare covalente închise (*CCI*) în diferite sisteme biologice s-a concentrat asupra a patru intermediari de replicare posibili, pe care îi prezentăm în fig. 39.

Mecanismele propuse pentru replicarea DNA circular au o caracteristică comună și anume scindarea cercului în timpul replicării cu sco-

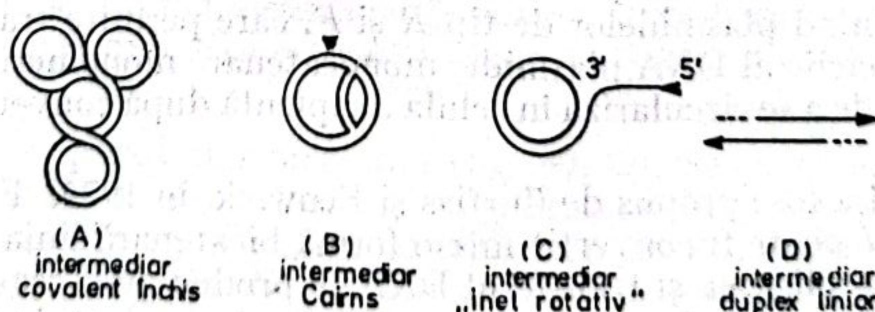


Fig. 39. Patru intermediari posibili care pot apare în cursul multiplicării DNA plasmidic.

pul de a permite separarea celor două catene parentale. Diferențele care există între mecanisme constau atît în natura scindării, cît și a primerului necesar pentru sinteza catenelor-fiice. În cazul intermediarului *A* din fig. 39, care este o moleculă circulară închisă, replicarea presupune

existența unor sciziuni și închideri periodice, alături de schimbarea răsucirii moleculei. Astfel de procese ale intermediarului de replicare au fost descrise pentru o serie de molecule de DNA circulare de tipul DNA al virusului SV40, polioma și DNA mitocondrial (Kasamatsu și Vinograd, 1974). Intermediarul *B* prezintă caracteristica „furcii" de replicare, sugerată de Cairns și posedă o sciziune permanentă. În plus, pentru replicare, el are nevoie de un primer (la fel ca și intermediarul *A*) care să inițieze sinteza DNA. Al treilea model de replicare, bazat pe intermediarul *C* de tipul „inelului rotativ", implică existența unei sciziuni stabile pentru adiția deoxiribonucleotidelor noi la catenele parentale. În sfîrșit, intermediarul *D* este o moleculă de DNA bicatenară liniară rezultată din scindarea DNA circular conform mecanismului descris anterior.

Majoritatea cercetătorilor angajați în studiul replicării și transferului plasmidelor preferă modelul de replicare bazat pe sistemul inelului rotativ. În acest model ipotetic se consideră că o proteină inițiator produce o sciziune în DNA plasmidic *CCI*, convertindu-l într-o formă circulară deschisă. Catena ruptă, astfel produsă, poate fi transferată începînd cu capătul ei 5'-terminal. În schimb, celălalt capăt (3'—OH), rămîne fixat prin legături de hidrogen de catena intactă, circulară, a DNA și poate astfel iniția sinteza continuă a catenei de DNA care să o înlocuiască pe cea transferată. Acest mecanism permite transferul continuu al unei singure catene de DNA plasmidic celulelor recipiente, astfel ca cele mai multe dintre ele să primească DNA în exces față de lungimea DNA plasmidic monocatenar monomeric. Transferul unei lungimi mai mari de DNA este necesar pentru păstrarea informației genetice în timpul reformării stării bicatenare. Prin urmare, în forma sa cea mai simplă, modelul inelului rotativ necesită existența în celula donoare a unei proteine-inițiator cu activitate de sciziune, a unei DNA-polimeraze și a unei DNA-ligaze pentru a închide ruperea monocatenei după terminarea transferului.

În continuare se va prezenta un model de replicare și transfer al DNA aparținînd plasmidelor de tip *R* și *F*, care permite transferul discontinuu și ciclic al DNA plasmidic monocatenar monomeric, posedînd capacitatea de a se circulariza în celula recipientă după conversia în formă bicatenară.

Modelul a fost propus de Curtiss și Fenwick, în 1975. El presupune că DNA *CCI* poate fi convertit într-o formă bicatenară liniară cu capete coezive, iar replicarea și transferul DNA se produc pe această matrice. Capetele coezive conțin aproximativ 10—20 de nucleotide, dar pentru motive de simplificare se indică numai cinci perechi de nucleotide.

În fig. 40, *A* este reprezentat DNA plasmidic în stare de repaus, așa cum se găsește în citoplasmă. În momentul în care această moleculă ajunge în contact cu un receptor adecvat ea se asociază cu membrana interioară, iar ambele sale catene sînt scindate pentru a da naștere

la structura circulară deschisă arătată în fig. 40, *B*. Molecula aceasta poate să-şi asume o conformaţie liniară bicatenară avînd capetele monocatenare (fig. 40, *c*). Datorită unei DNA-polimeraze, capetele monocatenare vor deveni şi ele bicatenare, astfel că toată molecula se trans-

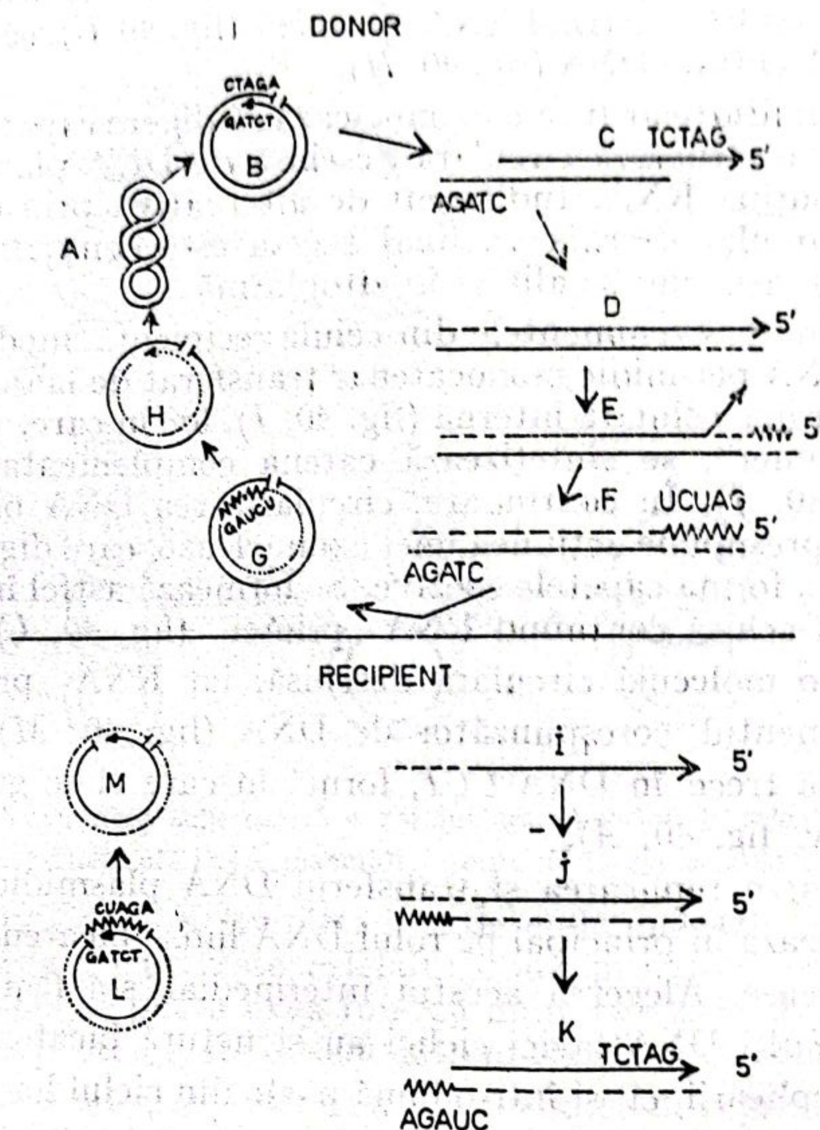


Fig. 40. Modelul replicării şi al transferului DNA plasmidic utilizînd DNA liniar ca matriţă (după *Curtiss* şi *Fenwick*, 1975).

formă într-un duplex liniar bicatenar (fig. 40, *D*). Se consideră că moleculele de acest fel se acumulează pe membrana celulară interioară.

În continuare, se postulează sinteza unui RNA „primer" la capătul 5'-terminal (fig. 40, *E*). Fixarea RNA-polimerazei se face în zona capătului coeziv, iar secvenţa nucleotidelor din acest loc trebuie să conţină situsul de iniţiere a sintezei pentru RNA „primer". Într-o altă variantă ar exista o proteină-iniţiator la capătul 5'-terminal, care ar specifica locul de fixare a RNA-polimerazei. Odată ce se sintetizează catena complementară, o catenă de DNA plasmidic se transferă la o celulă recipientă (fig. 40, *I*), iar molecula bicatenară liniară rămîne

atașată de membrana celulară a celulei donoare. În această etapă se iau în considerare două posibilități pentru reformarea ca donor a DNA plasmidic circular.

Prima dintre acestea, ilustrată în fig. 40, *G—H*, presupune că o exonuclează digeră capătul 3' al duplexului pentru a forma o moleculă circulară deschisă, păstrînd RNA „primer" (fig. 40, *G*), care este apoi îndepărtat și înlocuit de DNA (fig. 40, *H*).

A doua posibilitate ar fi ca o exonuclează să digere capătul 5' al moleculei, formînd o structură circulară deschisă de DNA plasmidic, fără ca acesta să conțină RNA. Indiferent de alternativa prin care a luat naștere DNA circular deschis, în final acesta este convertit în formă *CCI* (fig. 40, *A*), așa cum se află el în citoplasmă.

Trecînd acum la evenimentele din celula recipientă, modelul descris presupune că DNA plasmidic monocatenar transferat de la donor se atașează de membrana celulară internă (fig. 40, *I*), loc în care, cu ajutorul unui RNA „primer", se sintetizează catena complementară a DNA plasmidic (fig. 40, *J*). În continuare, circularizarea DNA plasmidic în celula recipient presupune acțiunea unei exonucleaze, care digeră nucleotidele 3' pentru a forma capetele coezive. Se formează astfel întîi o moleculă circulară deschisă conținînd RNA „primer" (fig. 40, *L*), care este convertită într-o moleculă circulară deschisă, iar RNA „primer" este înlocuit cu segmentul corespunzător de DNA (fig. 40, *M*). În final, această moleculă trece în DNA *CCI*, formă în care el se găsește liber în citoplasmă (v. fig. 40, *A*).

Modelul pentru replicarea și transferul DNA plasmidic prezentat în fig. 40 se bazează în principal pe rolul DNA liniar bicatenar ca intermediar de replicare. Alegerea acestui intermediar s-a făcut pe baza observației că mulți DNA fagici ciclici au structură bicatenară liniară atît în timpul replicării, cît și într-o bună parte din ciclul lor de viață.

V.1.6.1. **Rolul complecșilor de relaxare în replicarea DNA plasmidic.** Procesele biochimice care au loc la originea replicării DNA plasmidic sînt insuficient de cunoscute în momentul de față. Un fapt este însă clar și anume că scindarea uneia sau a ambelor catene de DNA trebuie să se realizeze în timpul replicării cu scopul de a permite dezrăsucirea și separarea catenelor nou scindate. Un candidat pentru această funcție de scindare este complexul de relaxare a DNA plasmidic superîncolăcit, descris pentru plasmidele *Col*, *R* și factorul de sex *F*.

Proprietatea principală a complexului de relaxare a DNA plasmidic izolat din celule de *E. coli* este conversia DNA plasmidic superîncolăcit la o formă circulară deschisă.

Analiza proteinelor din complexul de relaxare a pus în evidență trei componente cu masele moleculare relative de 60 000, 16 000 și 11 000. Este de reținut faptul că după tratamentul cu DDS al complexului de relaxare, proteina de 60 000 daltoni rămîne asociată cu catena scindată a DNA circular deschis, ceea ce sugerează că această proteină este legată covalent de catena de DNA. Se consideră că proteina de 60 000

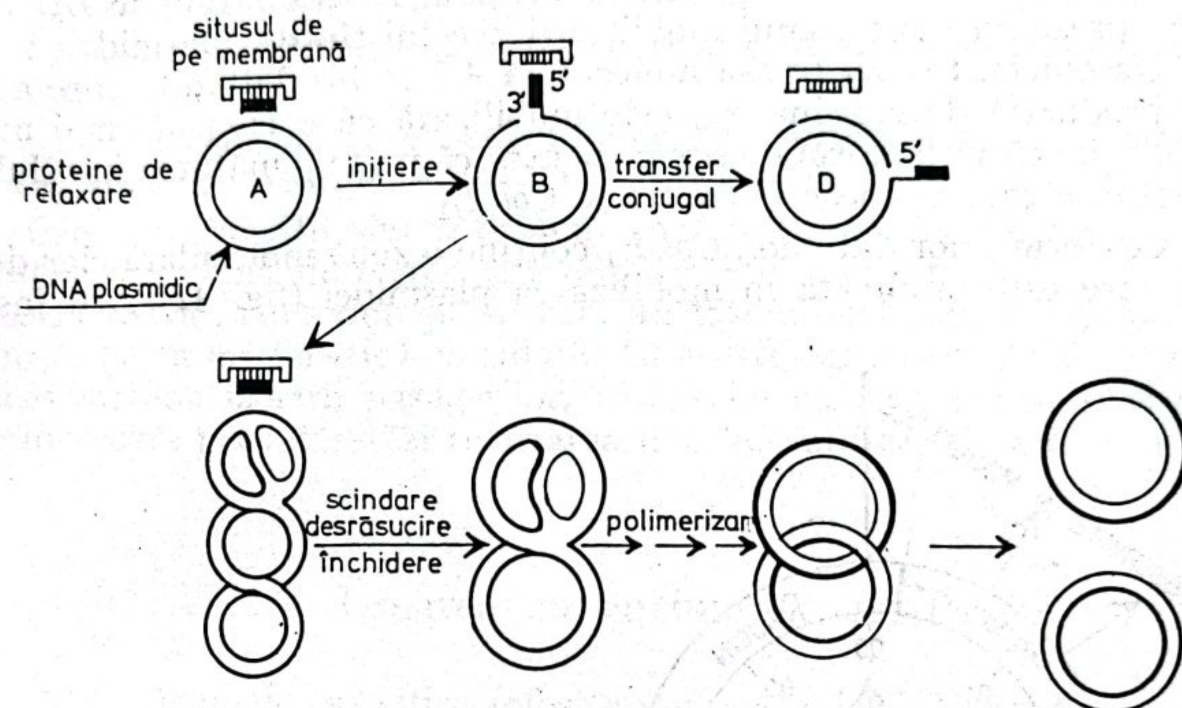


Fig. 41. Prezentarea schematică a rolului complexului de relaxare în replicarea și transferul DNA plasmidic (după *Helinski* și colab., 1974).

ar putea avea două activități: una de endonuclează și alta de transferază. În ceea ce privește celelalte două proteine, ambele sau numai una dintre ele ar putea avea funcția unui represor al activității endonucleazice a proteinei de 60 000 daltoni (Helinski și colab., 1974).

Rolul posibil al complexului de relaxare în replicarea și transferul conjugat al DNA plasmidic este prezentat în fig. 41. În acest model se propun mai multe funcții pentru complexul de relaxare și anume: promovează asocierea DNA plasmidic cu situsul de replicare de pe membrană (A), catalizează atît scindarea unei catene a DNA plasmidic în locul specificat de către un „semnal", cît și formarea legăturii covalente între componenta proteică și capătul 5'-terminal al catenei scindate (B), închide catena scindată după dezrăsucirea catenelor de DNA (C), facilitează transferul catenei scindate în celula recipientă în timpul conjugării bacteriene *(bacterial motion)* (D).

Se consideră că legarea proteinei de DNA mai are și rolul de a determina conservarea conținutului ridicat de energie a legăturii fosfodiesterice scindate, de a proteja catena scindată de acțiunea exonucleazelor și de a facilita transferul DNA plasmidic la celula recipientă.

V.1.7. Mobilizarea (transferul) plasmidelor curent folosite în tehnologia DNA recombinant

Cercetări curente au arătat că mobilizarea plasmidelor nu se face accidental sau printr-un proces pasiv. Întrucît plasmidele *Col* E_1 și unele derivate ale sale ca *pMB9*, *RSF2124*, *pBR313* și altele sînt curent folosite ca vectori pentru a introduce DNA străin în *E. coli*, se va prezenta mecanismul mobilizării acestui tip de plasmidă.

De obicei, *Col* E_1 (masa moleculară $4{,}2 \times 10^6$ daltoni), care codifică producția de colicină E_1, este mobilizată cu o eficiență mai mare de 50% de către factorul de sex *F*, pentru că peste jumătate din celulele receptoare care primesc *F* conțin și *Col* E_1.

Conform unor date noi, *Col* E_1 conține o zonă moleculară clar definită care este implicată în mobilizarea plasmidei (fig. 42). Atît inser-

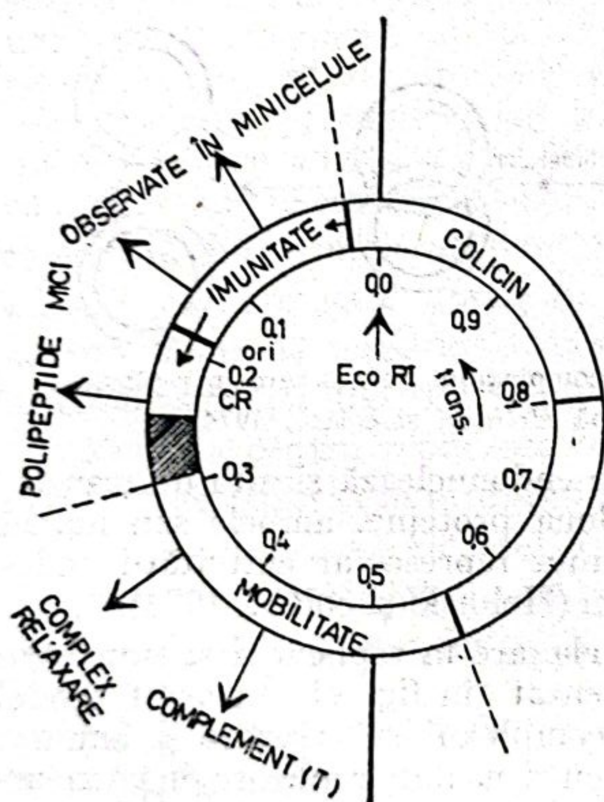


Fig. 42. Harta funcțională a plasmidei *Col* E_1 ($4,5 \cdot 10^6$ daltoni).

țiile, cît și delețiile din aceste regiuni conduc la apariția de fenotipuri (mob^-): mai puțin de 1 din 10^5 recipienți primesc o plasmidă *Col* E_1 mob^- față de *Col* E_1 mob^+.

Inserțiile lîngă poziția 0,27 (zona hașurată din fig. 42) în cazul plasmidei *RSF2124*, îi modifică mobilitatea. Mutanții *Col* E_1 mob^- au cantități mici de complex de relaxare (complex proteic găsit în DNA *Col* E_1) capabil de a introduce o crestătură într-o catenă de DNA plasmidic. Această observație sugerează rolul complexului de relaxare în procesul de mobilizare.

VI.1. Izolarea pasagerilor cu enzime specifice

Metoda cea mai simplă de a obţine un pasager constă în fragmentarea specifică a genomului unui organism, urmată de selecţia şi purificarea fragmentului care conţine pasagerul respectiv. Metoda poate fi aplicată direct numai dacă:

a) genomul poate fi izolat şi purificat;

b) harta genetică a organismului respectiv este cunoscută parţial sau total;

c) mijloacele utilizate pentru scindarea specifică a genomului nu distrug structura şi funcţia biologică a pasagerului de interes.

Cele trei condiţii sînt satisfăcute numai în relativ puţine situaţii. Acestea se rezumă de regulă la unele bacterii cum este *E. coli* şi unele virusuri (SV40, bacteriofagul λ) care au fost intens studiate şi, în consecinţă, harta lor genetică elucidată. În aceste cazuri se aplică cu mult succes metoda izolării pasagerilor, în special cu ajutorul unor enzime specifice care permit astăzi realizarea unei disecţii rapide a moleculelor de DNA.

VI.1.1. Izolarea cu enzime de restricţie

Între enzimele specifice folosite pentru izolare de pasageri, enzimele de restricţie ocupă un loc cu totul aparte. Dată fiind importanţa lor deosebită pentru tehnologia DNA recombinant ele sînt tratate într-un capitol special, motiv pentru care aici vom reda doar principiul întrebuinţării lor pentru izolarea de pasageri: genomul este scindat cu o enzimă (sau mai multe) de restricţie, iar fragmentele obţinute sînt purificate prin metoda electroforezei în gel de agaroză. După identificare, fragmentul (pasagerul) de interes este apoi eluat din gel şi utilizat pentru construcţia DNA recombinant.

Majoritatea organismelor eucariote nu au încă mapa genetică cunoscută. Aceasta nu înseamnă însă că din genomul acestor organisme nu se pot izola unii pasageri. În acest caz, alături de metoda enzimatică (v. reverstranscriptaza) sau cea chimică, se poate aplica şi o metodă indirectă. Ea constă în principiu din fragmentarea la întîmplare a genomului cu enzima de restricţie şi selecţia pasagerului prin tehnica hibridizării DNA-RNA. O astfel de metodă au folosit Maxam şi colab. (1977) pentru izolarea genei RNA ribozomal de 5 S din drojdie. S-a izolat DNA din tulpina diploidă de drojdie *A364a + D4* care a fost fragmentat mecanic. Fragmentele obţinute au fost introduse într-o serie de plasmide. Acestea au fost la rîndul lor fragmentate cu enzima de restricţie Eco *RI*, iar fragmentele rezultate au fost supuse testului de hibridizare cu RNA ribozomali de 5 S, 5,8 S, 18 S şi 28 S. Dintre toate fragmentele existente

11 — Tehnologia — cd. 669

numai fragmentul denumit *B*, avînd o lungime de 2 600 perechi de nucleotide, s-a hibridizat cu molecula de rRNA 5 S. De aici s-a dedus că fragmentul *B* conţine gena rRNA de 5 S.

VI.1.2. Alte metode enzimatice

Hegden şi colab. (1972) au propus o metodă ingenioasă de localizare şi separare a locului de legare a RNA polimerazei de DNA. În acest scop ei au tratat DNA cu RNA polimerază, iar complexul rezultat a fost supus acţiunii DN-azei. Această nuclează a hidrolizat molecula de DNA cu excepţia porţiunii de moleculă care a interacţionat cu RNA polimeraza. În continuare, porţiunea de DNA protejată, care este de fapt tocmai situsul de legare a RNA polimerazei de DNA, a fost separată de fragmentele de DNA digerate de DN-ază prin trecerea amestecului peste o coloană de Sephadex G-100.

Pe un principiu asemănător se bazează şi izolarea unor operatori. În acest caz se pune în contact operatorul cu represorul său pentru a se forma un complex care protejează selectiv operatorul de acţiunea distructivă a unor enzime. Pirrotta (1973) realizează izolarea operatorului *lac* din bacteriofagul λ în felul următor: DNA din fagul λ este fragmentat prin ultrasonicare. Se obţin fragmente cu masa moleculară de $3-6 \times \times 10^5$ daltoni. Acestea sînt întîi tratate cu represorul operatorului *lac* şi apoi trecute peste o membrană de nitroceluloză. Pe membrană rămîn numai fragmentele de DNA complexate cu represor, iar celelalte trec prin membrană. Fragmentele de DNA complexate cu represor sînt îndepărtate de pe filtru cu ajutorul dodecilsulfatului (DDS). După îndepărtarea DDS, ele fiind disociate de represor sînt din nou complexate cu represor, tratate cu DN-ază timp de 2 min. la 6°C. Amestecul se filtrează rapid printr-o membrană de nitroceluloză şi se spală. Extracţia operatorului pur se face în final cu un tampon conţinînd DDS

VI.2. Sinteza enzimatică a pasagerilor

VI.2.1. Transferul de informaţie de la RNA la DNA

Pînă în jurul anului 1970 se considera că în organismele procariote şi eucariote fluxul informaţiei genetice se transmite numai în sensul precizat de relaţia:


DNA → RNA → PROTEINE

care reprezintă de fapt dogma centrală a geneticii moleculare. Este meritul incontestabil a lui Temin de a fi convins cu experiențele sale întreaga lume științifică că, în relația de sus, este mai corect să fie așezate două săgeți între DNA și RNA: una îndreptată spre RNA, iar cealaltă spre DNA, întrucît informația genetică poate fi transmisă în ambele sensuri

$$RNA \rightleftharpoons DNA.$$

Sau, cu alte cuvinte, este posibil ca un RNA să fie modelul sau matrița pentru a sintetiza un DNA. Mai mult chiar, fără să fi urmărit în mod special această idee, Temin a reușit să descopere în același timp, însă alături de alte procese biologice importante, o cale nouă și nesperată de a sintetiza molecule de DNA folosind ca matrițe moleculele de RNA.

Descoperirile lui Temin au fost făcute pe virusuri tumorale RNA. Efectuînd studii radiobiologice și de altă natură, el a dedus că trebuie să existe o relație genetică stabilă între genomul virusului sarcomului Rous (virus tumoral RNA) și celula gazdă. Pe baza acestor studii el a emis ipoteza că virusurile tumorale RNA se multiplică cu ajutorul unui DNA intermediar care se integrează în celula gazdă. La început, foarte puțini au luat în serios această ipoteză a lui Temin, deoarece nimeni nu credea în posibilitatea capacității RNA de a codifica DNA. Dar, încăpățînarea lui Temin a fost în final încununată de succes, pentru că în momentul în care s-a descoperit în virusurile tumorale RNA o enzimă specială — o DNA polimerază RNA dependentă denumită și reverstranscriptaza — posibilitatea transferului de informație de la RNA la DNA a fost general acceptată. Dată fiind importanța deosebită a reverstranscriptazei pentru sinteza de pasageri, vom reda întîi unele detalii privind identificarea și caracterizarea ei în virusurile tumorale RNA, ca apoi în final să prezentăm modul ei de folosire pentru sinteza de pasageri (gene).

VI.2.2. Unele proprietăți generale ale virusurilor tumorale RNA

Virusurile tumorale RNA sînt virusuri animale ai căror virioni conțin un genom RNA și o DNA polimerază. Ele au fost izolate de la reptile, păsări și diferite animale. Este important de precizat că virusurile de acest tip nu au fost izolate de la om.

Caracteristica principală a acestor virusuri este aceea că produc leucemii, sarcoame, carcinoame, infecții letale rapide cu anemie și necroză, infecții lente ale sistemului nervos și plămînilor și cel mai frecvent fără boală.

Se numesc virusuri tumorale deoarece o parte din aceste virusuri sînt oncogene. Totuși nu toate aceste virusuri produc tumori. Ele se mai numesc și leucovirusuri, Rous-virusuri, oncornavirusuri, retrovirusuri, ambivirusuri, oncovirusuri și ribodeoxivirusuri. În ultimul timp

denumirea de *ribodeoxivirusuri* pare a fi preferată față de celelalte (Temin, 1974).

Ribodeoxivirusurile prezintă o importanță deosebită din următoarele motive principale:

1) sînt singurele organisme în care transferul informației genetice are loc în sensul RNA → DNA → RNA, deoarece posedă o enzimă care realizează sinteza de DNA pe model de RNA;

2) unele din aceste virusuri, cum este virusul sarcomului Rous, sînt cei mai eficienți agenți carcinogeni cunoscuți pentru animale sau culturi celulare;

3) unele virusuri de acest fel sînt cauza directă a unor cancere „naturale“ la pui și șoareci.

VI.2.3. Descoperirea DNA polimerazei RNA dependentă (reverstranscriptază)*

Lucrările lui Temin și colaboratorii săi au deschis un orizont nebănuit în biologia moleculară. Datorită originalității lor ele au fost răsplătite în anul 1976 cu Premiul Nobel pentru fiziologie și medicină. Aceste lucrări au pus bazele înțelegerii mecanismului de transformare a celulelor normale în celule neoplazice prin intermediul virusurilor RNA oncogene și, ceea ce interesează în mod deosebit tehnologia DNA recombinant, au arătat posibilitatea transferului de informație de la RNA la DNA.

În anul 1963, Temin — studiind efectele actinomicinei *D* asupra multiplicării virusului sarcomului Rous (VSR) — a constatat că atît producerea de virus, cît și sinteza RNA sînt inhibate de către actinomicina *D*.

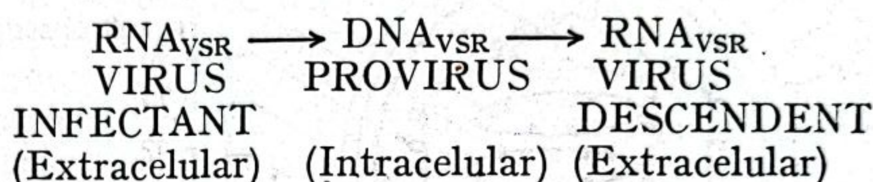
Această constatare era în totală contradicție cu cunoștințele existente la acea dată privind efectul actinomicinei *D* asupra multiplicării virusurilor RNA. Întrucît actinomicina *D* inhibă sinteza de RNA dependentă de DNA, toate virusurile RNA (cu excepția virusului gripal) multiplicîndu-se prin intermediul RNA-bicatenar sînt insensibile față de acest antibiotic. Or, producerea VSR fiind sensibilă la actinomicină rezultă că în cursul multiplicării VSR intervine, printr-un mecanism necunoscut, un DNA care participă la sinteza RNA viral. Cum VSR conține numai RNA, aceasta înseamnă că acest RNA generează într-o anumită etapă un DNA necesar multiplicării virusului.

---

*DNA polimeraza RNA dependentă este denumită și reverstranscriptază, deoarece transcrie informația genetică invers față de transcriptaza obișnuită care realizează transferul informației de la DNA la RNA.

Ulterior s-a constatat că inhibiţia multiplicării VSR se datorește atît inhibiţiei sintezei DNA celular, ceea ce conduce de fapt la împiedicarea multiplicării celulare, cît și inhibiţiei sintezei unui DNA dirijată de virus.

Datele obţinute au condus la formularea ipotezei *provirusului*, conform căreia replicarea virusului sarcomului Rous implică întîi formarea unui DNA cu rol de intermediar care, pe de o parte, se multiplică odată cu multiplicarea celulară prin transferul de informaţie DNA → DNA, iar pe de altă parte prin transferul de informaţie DNA → RNA, cînd participă la sinteza RNA din virusul descendent (Temin, 1970). Această ipoteză poate fi redată schematic astfel:



Cu alte cuvinte, cînd un virus tumoral RNA infectează o celulă, genomul viral RNA este transcris într-un genom viral DNA, care devine o parte integrantă din genomul celular (provirusul). În etapa finală, genomul viral DNA este transcris în genomul viral RNA realizîndu-se în acest fel ceea ce părea imposibil pînă atunci, și anume, transferul de informaţie de la RNA la DNA și de aici din nou la RNA. Reamintim aici că dogma centrală a biologiei moleculare considera posibil numai transferul de informaţie în sensul DNA → RNA → proteină.

Odată cu acumularea datelor experimentale menţionate, precum și cu apariţia altora de același fel, s-a pus întrebarea: care este natura enzimei responsabilă pentru sinteza de DNA dependentă de RNA din virusul sarcomului Rous? Primele experienţe efectuate în acest sens au stabilit că sinteza de DNA dependentă de VSR nu este condiţionată de o sinteză proteică nouă. În etapa următoare a cercetărilor s-a ajuns însă chiar la descoperirea unei enzime noi, avînd proprietatea de a sintetiza DNA pe modelul RNA viral, motiv pentru care ea a fost denumită DNA polimerază RNA dependentă (Temin și Mizutani, 1970; Baltimore, 1970).

VI.2.3.1. **Proprietăţile DNA polimerazei RNA dependentă.** Activitatea DNA polimerazei RNA dependentă poate fi măsurată fie în absenţa unei matriţe adăugate, și în acest caz se vorbește de o *reacţie endogenă* (RNA viral servește ca matriţă), fie atunci cînd se adaugă un acid nucleic străin (sau exterior) la virusul disrupt sau la enzima purificată, iar reacţia se numește în acest caz *exogenă*. Reacţia exogenă decurge mult mai repede decît cea endogenă. Fără îndoială că reacţia endogenă este importantă pentru implicaţiile sale biologice deosebite în care este implicată, iar reacţia exogenă este importantă pentru sinteza de molecule de DNA pe matriţe de RNA.

Este bine de precizat că DNA polimeraza dependentă de RNA se găseşte şi în celule normale, neinfectate cu virus.

a) Localizarea şi purificarea DNA polimerazei RNA dependente. DNA polimeraza este situată în interiorul particulei virale (fig. 57). Tratamentul virusului cu detergenţi în prezenţa unor săruri în concen-

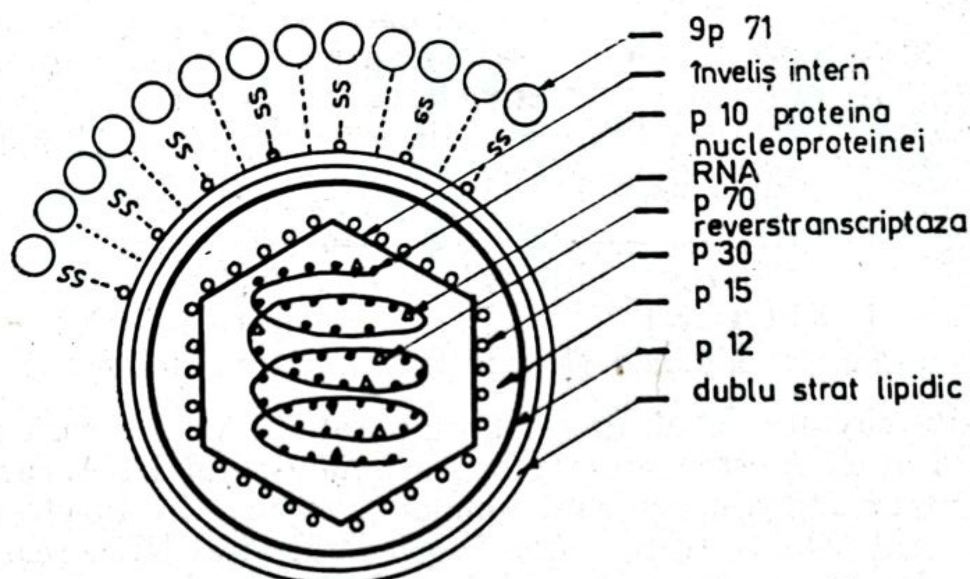


Fig. 57. Structura oncornavirusurilor de tip C murin (după *Bolognesi* şi colab., 1977).

traţie mai mare de 0,1 M determină ca învelişul lipidic al virusului să fie distrus, iar activitatea enzimatică se pune în evidenţă atît în miezul virionului, cît şi în fracţiunea solubilizată sub formă de enzimă solubilă (Coffin şi Temin, 1971). Alţi autori, cum sînt Kacian şi colab. (1971), recomandă concentraţii relativ mari de detergenţi şi săruri (0,7% dezoxicolat, 7% Nonidet P-40 şi KCl 0,8 M) pentru izolarea enzimei. S-a constatat însă că este suficient ca virusul să fie tratat cu eter sau cu detergenţi neionici în prezenţa a mai puţin de 0,1 M sare, ca să se elibereze cantităţi semnificative de enzimă solubilă. Aceasta ar putea deriva din miezul virionilor sau s-ar putea ca ea să existe în stare solubilă în virionii intacţi.

Purificarea enzimei solubile s-a făcut prin combinarea mai multor procedee de purificare utilizînd schimbători de ioni, ultracentrifugare, gel-filtrări şi precipitări selective (Verma şi colab., 1971).

b) Activitatea enzimei în virioni. Virusurile tumorale RNA au în mod obişnuit o activitate polimerazică, dar dacă ei sînt disrupţi cu detergenţi activitatea polimerazică creşte de 20 pînă la 50 ori. Această creştere se datoreşte distrugerii învelişului virusului şi eliberării polimerazei care poate astfel interacţiona cu substratul (nucleozidtrifosfaţii) după cum se va arăta în continuare.

Activitatea enzimatică este dependentă de concentraţia de detergenţi. Leucovirusurile aviare şi murine se comportă diferit atît faţă de

cantitatea de detergenți necesară pentru obținerea enzimei, cît și în ceea ce privește efectul inhibitor al excesului de detergenți. Acțiunea inhibitoare a excesului de detergenți se datorește în acest caz disocierii polimerazei de pe matriță. Pentru a împiedica această disociere, se recomandă ca detergentul să se adauge numai în cantitate necesară desfacerii învelișului virionilor.

c) Substraturile enzimei. Reacția endogenă de sinteză a DNA depinde de prezența celor patru dezoxiribonucleozidtrifosfați. Absența unuia din cei patru deoxiribonucleozidtrifosfați determină ca sinteza de DNA să nu aibă loc (Temin și Baltimore, 1972).

Ribonucleozidtrifosfații nu pot înlocui deoxiribonucleozidtrifosfații (Baltimore, 1971; Temin și Mizutani, 1970). Pînă în prezent nu s-a obținut sinteza unui produs acido-insolubil din ribonucleozidtrifosfați și virioni din virusuri tumorale RNA. De asemenea, în prezența celor patru deoxiribonucleozidtrifosfați și a DNA, încorporarea ribonucleozidtrifosfaților marcați într-un produs acido-insolubil nu are loc.

Sinteza de DNA este mult stimulată de prezența ATP și a sistemelor generatoare de ATP (Temin și Mizutani, 1970). Sistemele generatoare de ATP mai au și proprietatea de a stabiliza reacția în timpul unei incubații mai îndelungate.

Rolul ATP și al sistemelor generatoare de ATP pare să fie acela de substrat pentru nucleotidfosfataza prezentă în preparatele de virioni purificate și care hidrolizează trifosfații marcați sau este posibil ca ei să servească ca substrat pentru un sistem nucleotidkinazic, de asemenea descoperit în preparatele virale.

Prin urmare, se poate conchide că ATP ar avea un rol indirect în stimularea activității polimerazice prin reglarea pe care o exercită asupra nivelului substratului.

d) Cationii bivalenți și monovalenți. Sinteza de DNA dirijată de virioni este dependentă de prezența ionilor bivalenți. Ionii de Mg^{2+} în concentrații de 5—10 mM și ionii de Mn^{2+} în concentrații de 1—2 mM stimulează sinteza de DNA. Cu^{2+} nu are efect asupra reacției enzimatice.

Spre deosebire de ionii bivalenți care sînt absolut necesari, ionii monovalenți nu par a fi absolut necesari reacției enzimatice. S-a observat însă că reacția este stimulată cu 15—20% de concentrațiile scăzute (de ordinul a 20—30 mM) de sodiu sau potasiu. Dacă concentrația acestor ioni este mai ridicată, în loc să stimuleze ei inhibă reacția enzimatică. Este foarte posibil ca efectul inhibitor al concentrațiilor ridicate de ioni monovalenți să se datoreze disocierii DNA polimerazei de pe RNA endogen.

e) pH optim. Toate virusurile oncogene testate au arătat o activitate optimă a DNA polimerazei lor în jurul *p*H 8. S-a observat însă că activitatea enzimei se întinde peste un domeniu relativ larg de *p*H.

f) Temperatura optimă. S-a constatat că reacția endogenă are loc la o anumită temperatură optimă. Există însă o activitate enzimatică

mai ridicată la temperaturi cuprinse între 37° şi 40°C în cazul virusurilor animale şi cuprinse între 40°—45°C pentru virusurile aviare. Întrucît gazda aviară are o temperatură mai ridicată decît cea animală, diferenţele observate în ceea ce priveşte temperatura optimă a DNA polimerazei la cele două gazde de virusuri au făcut să se presupună că aceasta ar reflecta de fapt diferenţe existente între virusuri.

VI. 2.3.2. **Proprietăţile DNA polimerazei RNA dependentă purificată.** Aşa cum am arătat, enzima solubilă se poate izola din virionii disociaţi cu detergenţi şi săruri cu ajutorul cromatografiei cu schimbători de ioni, ultracentrifugării în gradient de glicerol şi al gel filtrării.

Mărimea DNA polimerazei s-a dovedit a fi dependentă de originea virusului din care a fost extrasă. Ross şi colab. (1971) au arătat că enzima din virusul murin are 70 000 daltoni, valoare estimată atît prin gel filtrare, cît şi prin ultracentrifugare. O valoare apropiată — 90 000 daltoni — stabilesc Hurwitz şi Leis (1972) pentru aceeaşi enzimă.

Enzima izolată şi purificată din virusurile aviare este mai mare; valorile obţinute variază între 110 000 şi 180 000 daltoni. Temin şi Baltimore (1972) consideră că valoare de 180 000 daltoni ar fi cea mai corectă pentru această enzimă. Analiza electroforetică a enzimei a pus în evidenţă prezenţa în preparatele purificate a două polipeptide, care par a fi subunităţile enzimei. Pentru enzima de origine murină se consideră că subunitatea este de 70 000 daltoni, în timp ce enzima de origină aviară are aceeaşi subunitate de 70 000, alături de o a doua subunitate de 110 000 daltoni.

Aspectele structurale ale enzimei nu pot fi încă discutate în detaliu, deoarece se cunosc puţine date care pot fundamenta o astfel de discuţie. Trebuie însă precizat că DNA polimeraza RNA dependentă reprezintă numai aproximativ 1% din proteinele virale.

a) Matriţele DNA polimerazei purificate. Polinucleotidul monocatenar de tip poli(dA) nu poate fi utilizat ca matriţă pentru DNA polimerază. În schimb, dacă acestui polinucleotid i se adaugă poli(dT) el devine foarte eficient în această funcţie, Baltimore şi Smaler (1971). Pe de altă parte, Mizutani şi colab. (1971), precum şi alţi autori, au arătat că atît RNA, cît şi DNA pot fi utilizaţi ca matriţe pentru DNA polimerază.

Hurwitz şi Leis (1972), pe baza propriilor lor rezultate obţinute, susţin că DNA bicatenar nu este eficient ca matriţă. Chiar o scindare a uneia dintre catene nu este suficientă pentru a-i conferi proprietatea de matriţă. În schimb, proprietatea de matriţă a DNA devine efectivă numai atunci cînd în polimerul bicatenar există o zonă monocatenară sub formă de buclă.

DNA polimeraza I din *E. coli* are şi ea proprietatea de a copia DNA monocatenar. Aceasta deoarece DNA monocatenar formează unele zone bicatenare intramoleculare prin interacţiunea bazelor din

același lanț, dînd naștere la unele „bucle" de-a lungul moleculei (Englund, 1971).

b) Prezența agenților reducători. Atît ditiotreitolul, cît și β-mercaptoetanolul stimulează activitatea enzimatică. Numai în prezența agenților reducători, activitatea enzimatică poate fi total exprimată. Cum acești agenți interacționează cu grupările —SH ale enzimei, blocarea acestora determină o modificare conformațională a enzimei determinînd prin aceasta ca centrii activi să intervină mai eficient în reacția de polimerizare.

c) Efectul ribonucleazei. Concentrații mici de RN-ază nu afectează activitatea polimerazică. În schimb, concentrații de 3—50 μg/ml produc o inhibiție de 75% a sistemului de sinteză a DNA prin intermediul DNA polimerazei RNA dependentă, care folosește ca matriță RNA. Concentrațiile mici de RN-ază fragmentează matrița în porțiuni relativ mari, care pot să catalizeze reacția enzimatică. Crescînd concentrația enzimei, fragmentele de RNA produse sînt mici, iar acestea nu își mai pot îndeplini funcția de matriță (McDonnell și colab. 1970).

d) Cinetica reacției. S-a observat că cinetica reacției dirijată de DNA polimerază depinde în principal de cantitatea de substrat, deoarece fosfatazele existente în preparatele virale micșorează rapid concentrația substratului prin eliberarea de fosfat, cît și de concentrația și stabilitatea matriței (RNA), care este fragmentat de ribonucleazele din virion. Cinetica pare a fi proporțională cu concentrația de proteină din virioni, Temin și Baltimore (1972).

e) Mecanismul reacției enzimatice. DNA polimerazele, indiferent dacă sînt dependente de DNA (cazul biosintezei DNA celular) sau RNA (reverstranscriptaza), sînt enzime dependente de un primer și pot copia numai regiuni monocatenare ale matriței. Este curios faptul că polinucleotide total monocatenare sau bicatenare nu pot fi utilizate ca primeri. Dar, adaosul catenei complementare la catena monocatenară determină conversia ei într-o matriță eficientă (Baltimore și Smaler 1971). Pe de altă parte, pot fi utilizate și polinucleotide bicatenare ca matriță, cu condiția să fie tratate cu DNA polimerază din *E. coli*, care are proprietatea de a produce deplasări ale catenelor DNA (Masamune și Richardson, 1971).

De asemenea, pot funcționa ca matrițe fie DNA monocatenar care formează „bucle" (Englund, 1971), fie copolimeri de tipul poli(dA-dT) care prin structura lor secundară — datorită interacțiunilor intracatenare ale polimerului — oferă unele zone monocatenare care pot servi ca locuri de inițiere a sintezei.

f) Rolul de matriță a RNA viral. Matrița naturală pentru DNA polimerază a virusurilor tumorale RNA este RNA viral 60—70 S, un complex care conține trei sau patru subunități de RNA cu mase moleculare mari (de aproximativ 35 S) și mai mulți RNA cu masă moleculară mică (5 S și 4 S). Aceștia din urmă sînt fie liberi, fie asociați cu compo-

nente de 70 S (RNA 70 S — 4 S). Ultimele cercetări arată că transcrierea DNA de pe RNA 70 S este inițiată de capătul 3' al moleculei de RNA-4 S care este legat prin legături de hidrogen de genomul viral (Dahlberg și colab., 1974).

g) Produsul reacției. Nucleaza din *Neurospora* digeră numai DNA monocatenar. Supus analizei cu această enzimă, produsul de reacție obținut, după aproximativ 20 de minute de sinteză, a arătat că este format atît dintr-un hibrid de DNA-RNA, cît și dintr-un DNA bicatenar (Manley și colab., 1971).

Trebuie precizat că produsul inițial al reacției, analizat într-un gradient de zaharoză, are un coeficient de sedimentare de 60—70 S, la fel ca și marea majoritate a RNA viral.

Ulterior, în timpul sintezei, probabil datorită acțiunii ribonucleazei virale, acest material este înlocuit de unul care sedimentează sub 10 S.

Prin urmare, produsul inițial al reacției este un complex molecular de 60—70 S compus din matrița de RNA și piese relativ mici de DNA nou sintetizate. După mai multe ore de incubație se sintetizează numai DNA pur, care este monocatenar și parțial bicatenar.

Pentru a explica dimensiunea mică a DNA sintetizat s-au emis mai multe ipoteze. Pe de o parte se presupune că unele scindări ale matriței ar atrage după sine sinteza unui DNA relativ mic, iar pe de altă parte există posibilitatea ca fragmentele mici de DNA să fie intermediari ai sintezei provirusului, pe care DNA ligazele virale le asamblează în structuri mai mari.

VI.2.3.3. Inhibitori ai reverstranscriptazei. *Actinomicina D.* Este cunoscut faptul că actinomicina *D* interacționează cu DNA, dar nu și cu RNA. Pentru acest motiv, sinteza polinucleotidelor dependente de DNA este inhibată, în timp ce sinteza dependentă de RNA nu este influențată.

De asemenea, trebuie precizat că actinomicina *D* în concentrație scăzută determină inhibiția sintezei de RNA dependentă de DNA, iar sinteza de DNA dependentă de DNA este inhibată de concentrații relativ ridicate de antibiotic (Reich, 1964).

Or, reacția endogenă de sinteză a RNA dependentă de DNA, dirijată de DNA polimerază, s-a dovedit a fi inhibată numai de concentrații ridicate de actinomicină; la o concentrație de 20—50 µg/ml de actinomicină *D* mai rămîne încă 30—50% din activitatea inițială a enzimei. Interpretarea care se dă acestei comportări este următoarea: sinteza de DNA dependentă de RNA nu este afectată de actinomicină, deoarece aceasta nu interacționează cu RNA, în schimb actinomicina inhibă numai sinteza de DNA dependentă de DNA, iar aceasta se produce numai la concentrații ridicate de antibiotic.

Totodată, s-a constatat că produsul format în prezența actinomicinei *D* constă în principal din DNA monocatenar și hibrizi DNA-RNA,

iar în absența actinomicinei se formează în special DNA bicatenar (Manley și colab., 1971).

Derivații rifampicinei. O serie de derivați ai rifampicinei s-au dovedit a fi chiar mai activi decît actinomicina *D* în inhibarea reverstranscriptazei. Se pare că acești derivați inhibă atît activitatea reverstranscriptazei dependentă de RNA cît și de DNA (Gurgo și colab., 1971).

VI.2.3.4. **Activitatea reverstranscriptazei din celulele neinfectate.** Coffin și Temin (1971) și apoi Chang și Temin (1972) au anunțat existența unei activități DNA polimerazice RNA dependentă, atît în cultura de fibroblaști de embrioni de șobolani, cît și în embrioni normali de pui. Activitatea este sensibilă la tratamentul cu ribonuclează, dar nu la acela cu deoxiribonuclează.

De aici s-a ajuns la generalizarea ideii că toate celulele au o enzimă capabilă de a dirija sinteza de DNA dependentă de RNA și că această enzimă nu are nimic comun cu DNA polimeraza celulară, ci mai degrabă cu DNA polimeraza virală din virusurile tumorale RNA.

Este dificil, pentru moment, de a se da o explicație pentru activitatea DNA polimerazică reverstranscriptazică a celulelor normale. Este posibil ca celula să aibă o origine dublă. Pe de o parte, această activitate poate fi prezentă în stare potențială în genomul celular neinfectat, pe de altă parte ea poate fi codificată de genomul viral. Nu se știe dacă inducția unui virus tumoral este rezultatul unei derepresii determinată numai de un provirus preformat, sau dacă inducția reprezintă un proces de recombinare și mutațional care conduce la formarea genomului viral.

În anul 1970, Temin a emis ipoteza *protovirusului* pentru a explica activitatea reverstranscriptazei din celulele neinfectate. Conform acestei ipoteze în celulele normale există un complex DNA polimerază-RNA (protovirusul), care are un rol special în dezvoltarea celulei. Virusurile tumorale RNA au derivat de la acest protovirus normal celular, iar în virionii virusurilor tumorale RNA, cît și în protovirusurile celulare, reverstranscriptazele sînt enzimele cheie care realizează transferul de informație.

VI.2.3.5. **Alte activități enzimatice existente în virusurile tumorale RNA.** În afară de activitățile enzimatice asociate cu multiplicarea virală, virusurile tumorale RNA conțin și alte activități enzimatice, care numai în anumite situații sînt necesare virusului. Se pare că enzimele acestea nu sînt codificate de informația genetică prezentă în genomul viral.

a) Ribonucleaza H. Molling și colab. (1971) au arătat existența unei ribonucleaze asociate cu DNA polimeraza purificată din virusul mieloblastozei aviare. Această enzimă degradează specific catena de RNA

dintr-un hibrid RNA-DNA și nu are efect asupra DNA sau asupra RNA monocatenar.

b) Deoxiribonucleaza. În tulpina Schmidt-Ruppin *D* a virusului sarcomului lui Rous, s-a descris o activitate dezoxiribonucleazică care a condus la scindarea DNA din fagul T7. S-au mai descris activități endo- și exonucleazice în diferite tulpini de virusuri tumorale RNA, dar ele nu au fost foarte bine caracterizate (Temin și Baltimore, 1972).

c) DNA-ligaza. Hurwitz și Leis (1972) au comunicat prezența activității ligazice în virionii virusului mieloblastozei aviare. Anterior însă, Mizutani și colab. (1971) au observat în nucleocapsida virionilor activitate ligazică, care a determinat legarea unor polinucleotide. Este de menționat de asemenea că prezența ligazei în virioni a fost postulată de Mizutani și colab. (1970) pentru a explica unele rezultate obținute cu endonucleaza DNA a virionilor. Acești autori au sugerat că ligaza ar putea ajuta la integrarea DNA proviral în DNA celular cu scopul de a produce un DNA mai mare din fragmentele de DNA produse de DNA polimeraza virală.

d) Alte activități enzimatice puse în evidență sînt: ATP-aza, proteinkinaza, nucleozidtrifosfatnucleotidiltransferaza, hexokinaza, lacticodehidrogenaza (Temin și Baltimore, 1972).

VI.2.4. Utilizarea reverstranscriptazei pentru sinteza pasagerilor (genelor)

Datele prezentate au arătat că reverstranscriptaza posedă patru activități enzimatice, care interesează sinteza și hidroliza moleculelor polinucleotidice:

1) activitate de DNA polimerază RNA dependentă, care conduce la sinteza de DNA pe model de RNA;

2) activitate de DNA polimerază DNA dependentă, care are ca efect sinteza de DNA bicatenar;

3) activitate RN-azică (*H*), care determină hidroliza RNA dintr-un hibrid DNA-RNA;

4) activitate de DNA-ligază.

Fără îndoială că pentru tehnologia DNA recombinant primele două activități sînt de interes, oferind posibilitatea de a sintetiza pasageri pe cale enzimatică. Sinteza aceasta este condiționată însă de posibilitățile existente azi, de izolare și purificare a mRNA, adică a acelui mRNA care dirijează sinteza hormonului, enzimei sau proteinei planificate a fi produse de DNA recombinant.

Din păcate izolarea și purificarea mRNA nu este întotdeauna posibilă, ceea ce face ca sinteza cu ajutorul reverstranscriptazei să fie limitată numai la situațiile, relativ puține, în care se poate obține un mRNA

pur, cum este cazul mRNA pentru hemoglobină (Kacian, 1972), mRNA pentru imunoglobulină (Diggelman și colab., 1973), mRNA pentru insulină (Ullrich și colab., 1977) și cîteva altele.

De notat de asemenea că sinteza pasagerilor — deci a moleculelor de DNA — pe model de mRNA, cu ajutorul reverstranscriptazei, determină în prima etapă sinteza unui DNA complementar (denumit pe scurt cDNA), avînd secvența bazelor complementară secvenței bazelor din mRNA și că reverstranscriptaza acționează în reacția exogenă pentru a produce cDNA pe model de mRNA numai atunci cînd este în prezența unui primer *. Acesta trebuie să aibă o structură specială și anume să posede secvența bazelor sale complementară matriței.

Întrucît majoritatea (dacă nu toți) mRNA de eucariote conțin la capătul lor 3′ secvențe de poli(A) ca primer, se întrebuințează un oligo(dT), fiind complementar cu poli(A). Primerul inițiază sinteza de cDNA de la capătul 3′ al matriței, iar copierea mRNA începe din acest punct și se termină îndată ce întreaga moleculă de mRNA este transcrisă în molecula de cDNA.

Rezumînd, trăsăturile principale ale sintezei de DNA pe model de mRNA în prezența reverstranscriptazei sînt următoarele:

1) sinteza cDNA este dependentă de un primer care, de obicei, este oligo(dT);

2) produsul sintezei este un cDNA monocatenar, care este o copie fidelă a mRNA;

3) în prezența actinomicinei se sintetizează un cDNA, a cărui lungime este egală cu aceea a mRNA folosit ca matriță;

4) în absența actinomicinei *D* se sintetizează un DNA bicatenar cu masă moleculară mai mică decît a cDNA;

5) cDNA sintetizat are proprietatea de a fi atît primer, cît și matriță pentru sinteza de DNA bicatenar (Salser, 1974).

Această ultimă caracteristică a reacției catalizate de reverstranscriptază merită a fi discutată, deoarece de fapt ea stă la baza sintezei moleculelor bicatenare de DNA recombinant. S-a observat că utilizînd cDNA ca matriță și reverstranscriptaza ca enzimă pentru a sintetiza DNA bicatenar, reacția nu are nevoie de prezența oligo(dT) ca primer. Totodată, s-a precizat că produsul obținut este legat covalent de matriță și are o structură particulară, prezentînd unele bucle (Verma și colab., 1973).

Datele prezentate (precum și altele) au sugerat că cea mai mare parte a cDNA are o structură monocatenară, iar la capătul 3′ există o buclă formată prin interacțiunea intramoleculară a bazelor (fig. 58).

---

* Primer = inițiator al sintezei polinucleotidice.

Această moleculă servește la inițierea și sinteza moleculei de DNA bicatenar. Etapele principale ale sintezei de DNA pe model de RNA sînt prezentate schematic în fig. 58.

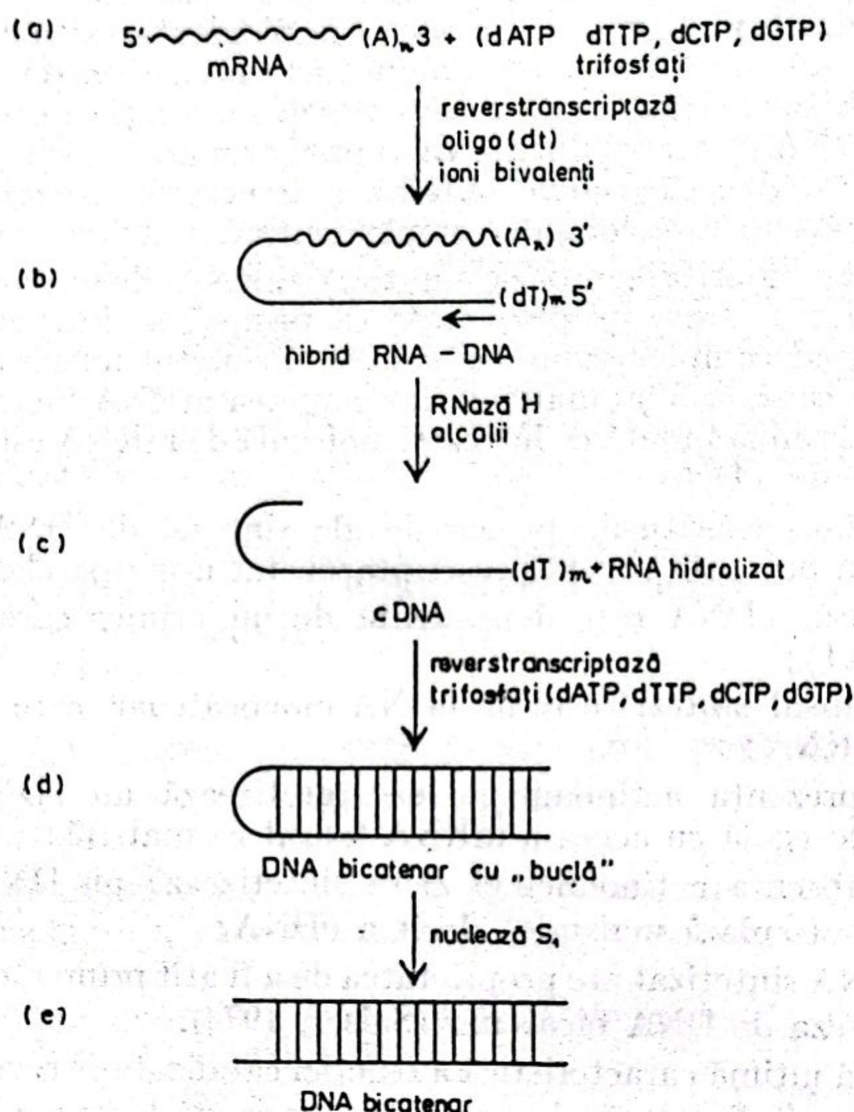


Fig. 58. Prezentarea schematică a sintezei pasagerilor cu ajutorul reverstranscriptazei:

a) amestecul de reacție conține: mRNA (matriță), oligo (dT) (primer), reverstranscriptază (enzimă), trifosfați (substrat) și ioni bivalenți; b) enzima sintetizează un hibrid mRNA-cDNA; c) componenta de RNA din hibrid este hidrolizată, fie enzimatic (preparatul de reverstranscriptază conține RN-ază H), fie chimic, cu alcalii, în urma cărui tratament se obține cDNA; acesta este monocatenar, iar la capătul 3' are o buclă; d) cDNA devine matriță și primer pentru prelungirea capătului 3' pînă cînd acesta ajunge egal cu capătul 5'; e) bucla se elimină prin tratamentul cu nuclează S_1, care acționează la nivelul buclei, unde molecula are baze neinteracționate. În final, se obține molecula de DNA bicatenar (pasagerul), avînd secvența bazelor complementară moleculei de mRNA.

VI.2.4.1. **Purificarea mRNA necesar sintezei de pasageri (gene).** Posibilitatea sintezei enzimatice a pasagerilor cu ajutorul reverstranscriptazei depinde în principal de izolarea și purificarea mRNA. În majoritatea cazurilor izolarea mRNA s-a bazat pe separarea celulelor diferențiate care produc numai una sau două proteine diferite. De exemplu, în cazul insulelor lui Langerhaus majoritatea celulelor sînt de tip *B*, care sînt producătoare de insulină. Omogenatul obținut din aceste celule în prezența tiocianatului de guanidină (4 M) și β-mercaptoetanol (1 M), la *p*H 5, supus centrifugării în clorură de cesiu (5,7 M), permite separarea mRNA specific sintezei insulinei (Ullrich și colab., 1977).

Procedee asemănătoare s-au aplicat și pentru celulele care sintetizează ovalbumină, hemoglobină sau alte proteine.

A doua metodă generală de separare și purificare a mRNA se bazează pe specificitatea de interacțiune dintre anticorpii unei anumite proteine și polizomii care conțin lanțuri polipeptidice nascente ale proteinei respective.

Tratamentul polizomilor cu anticorpi specifici oferă posibilitatea precipitării selective numai a polizomilor de care sînt atașați mRNA care codifică sinteza proteinei de interes. Separarea mRNA din polizomi se face după disocierea polizomilor cu EDTA. Astfel, Delovich și colab. (1972) au reușit să izoleze mRNA specific catenei L a imunoglobulinei din plasmacitoma șoarecelui $MOPC_{149}$, prin reacția polizomilor cu fragmente de $F(ab')^2$ obținute în urma tripsinizării antiserului de iepure anti-$MOPC_{149}$ catenă L. Alți autori au purificat γ-globuline antiovalbumină de pui (Palmiter, 1972) sau glutaminsintetază (Sarkar și Moscona, 1973), pentru a precipita selectiv mRNA specifici din polizomi. Acești mRNA purificați s-au dovedit a fi capabili să dirijeze sinteza *in vitro* a proteinelor specifice, dovedindu-se în acest fel și puritatea lor. Un dezavantaj al metodei constă în aceea că ea permite izolarea numai a mRNA atașați de ribozomi, specificitatea ei fiind limitată la polipeptidele nascente. Or, cantitatea de mRNA atașați de ribozomi este în general mică.

A treia metodă generală recomandată pentru izolarea de mRNA specific este cea descrisă de Stevens și Williamson (1973). Ea permite izolarea atît a mRNA, cît și a precursorilor lui, tot pe bază imunochimică.

VI.3. Sinteza chimică a pasagerilor (genelor)

Sinteza moleculelor mari de DNA pe cale pur chimică nu s-a realizat încă datorită unor dificultăți care apar în principal la asamblarea chimică a catenelor lungi de polinucleotide. Aceste dificultăți au determinat ca sinteza totală a genei pentru $tRNA^{Ala}$, realizată de grupul lui

Khorana (v. Agarwal și colab., 1970) sau cele mai recente lucrări ale grupului lui Itakura, privind sinteza genei pentru somatostatină (Itakura, și colab., 1977) sau a genelor pentru insulină (Crea și colab., 1978) să nu fie realizată numai prin metodele chimiei organice. În aceste cazuri a fost necesar să se combine metodele chimiei organice, care permit doar sinteza oligonucleotidelor cu o secvență dorită, cu concepte și metode proprii chimiei biologice, care la rîndul lor au descoperit și dezvoltat metode specifice de legare a oligonucleotidelor între ele. Strategia adoptată atît de grupul lui Khorana, cît și de cel al lui Itakura pentru sinteza chimică a unor gene a implicat realizarea a două etape fundamentale și anume:

1) sinteza chimică a unor segmente de deoxipolinucleotide cu lungimea medie a catenei de 8—12 unități;

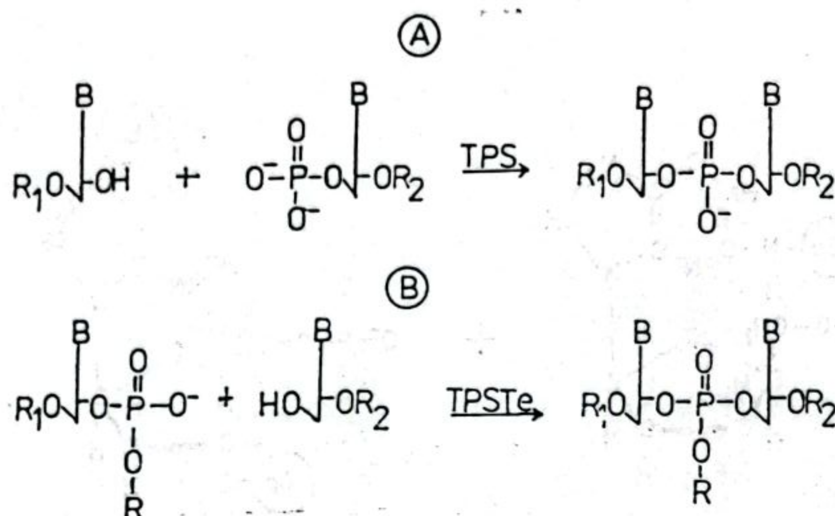
2) legarea cap la coadă a segmentelor corespunzătoare de deoxipolinucleotide cu ajutorul DNA-ligazei.

Prima etapă este realizată cu ajutorul metodelor chimiei organice, în timp ce a doua se realizează prin metode enzimatice. Întrucît întreaga moleculă de DNA este construită de fapt din deoxipolinucleotide sintetizate pe cale chimică și numai legarea lor se face pe cale enzimatică, sinteza este considerată a fi de natură chimică.

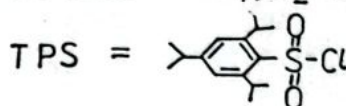
Sinteza de deoxipolinucleotide — unitățile de construcție a pasagerului sau a genelor, în general — se face prin două metode diferite. Prima, preconizată de grupul lui Khorana (Khorana 1968 a, b; Gupta și colab. 1968 a, b, c; Agarwal și colab. 1970), constă în esență în sinteza de di- și trinucleotide, care sînt apoi condensate între ele pentru a obține pentanucleotide. În continuare, condensarea unui pentanucleotid cu un trinucleotid dă naștere unui octanucleotid ș.a.m.d. Prin această metodă s-a ajuns la sinteza unor catene care au conținut 20 de nucleotide (icosa I și icosa II), cu secvența dorită, și ea a stat la baza sintezei totale a genei pentru $tRNA^{Ala}$ (Agarwal și colab., 1970).

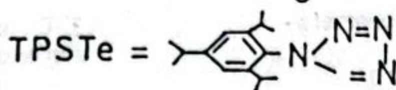
A doua metodă, mai recentă, folosită de grupul lui Itakura pentru sinteza chimică a genei pentru somatostatină și a genelor pentru insulină umană, se bazează pe sinteza unor trimeri bifuncționali ca blocuri de construcție pentru sinteza oligodeoxiribonucleotidelor cu secvența dorită.

Fundamentală pentru ambele metode este blocarea selectivă a grupărilor funcționale ale nucleotidelor cu grupări protectoare și păstrarea liberă numai a acelor grupări care intră în reacție în momentul dorit. Cele două metode notate cu *A* și *B* în fig. 59, diferă între ele prin strategia aleasă pentru sinteza deoxipolinucleotidelor, prin tipul de grupări protectoare folosite, precum și prin agentul de condensare specific întrebuințat (Itakura și Riggs, 1980).



B= baze R_1, R_2 =grupe protectoare

TPS =


TPSTe =


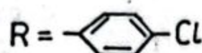
R =


Fig. 59. Cele două metode principale de sinteză chimică a DNA: (A) metoda diesterilor; B) metoda triesterilor (după *Itakura* și *Riggs*, 1980).

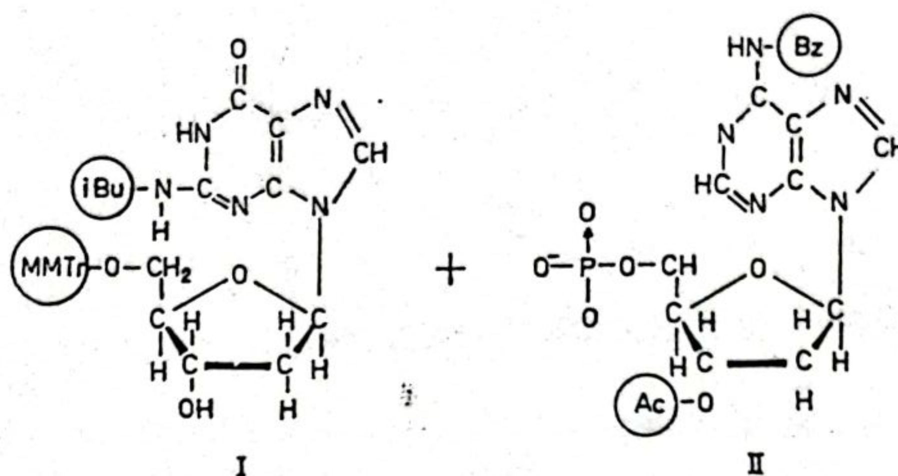
VI.3.1. Metoda I-a sau metoda fosfodiesterilor a lui Khorana și colab.*

Sinteza începe de la capătul 5'-hidroxilat al DNA, iar prima legătură internucleotidică se realizează prin condensarea N-izobutiril-5'-monometoxitritildeoxiguanozinei (dMMTr-G^{iBu}) — componenta I din fig. 60 cu 3'-O-acetil-N-benzoiladenozin-5'-fosfat (dpA^{Bz}-OAc) — componenta II din fig. 60 în prezența diciclohexilcarbodiimidei (DCHCDI) ca agent de condensare.

În etapa următoare se realizează condensarea succesivă dintre blocuri de di-, tri- și mai tîrziu tetranucleotide la capătul 3'-hidroxilat al catenei crescînde de polinucleotid, avînd toate celelalte grupări funcționale protejate.

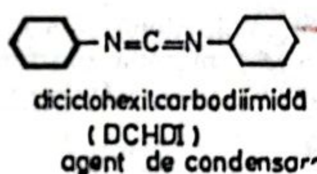
Sinteza generală descrisă de Agarwal și colab. (1970) pentru sinteza unui segment de DNA conținînd 20 de nucleotide este următoarea:

* Denumirea de metodă fosfodiesterică derivă de la particularitatea ei de a utiliza pentru sinteza DNA compuși intermediari fosfodiesterici.



N-izobutiril-5'-monometoxitritildeoxiguanina ($dMMTr\ G^{iBu}$) primul nucleotid protejat

3'-O-acetil-N-benzoildeoxiadenozin-5'-fosfat (dpA^{Bz}—OAc) al doilea nucleotid protejat



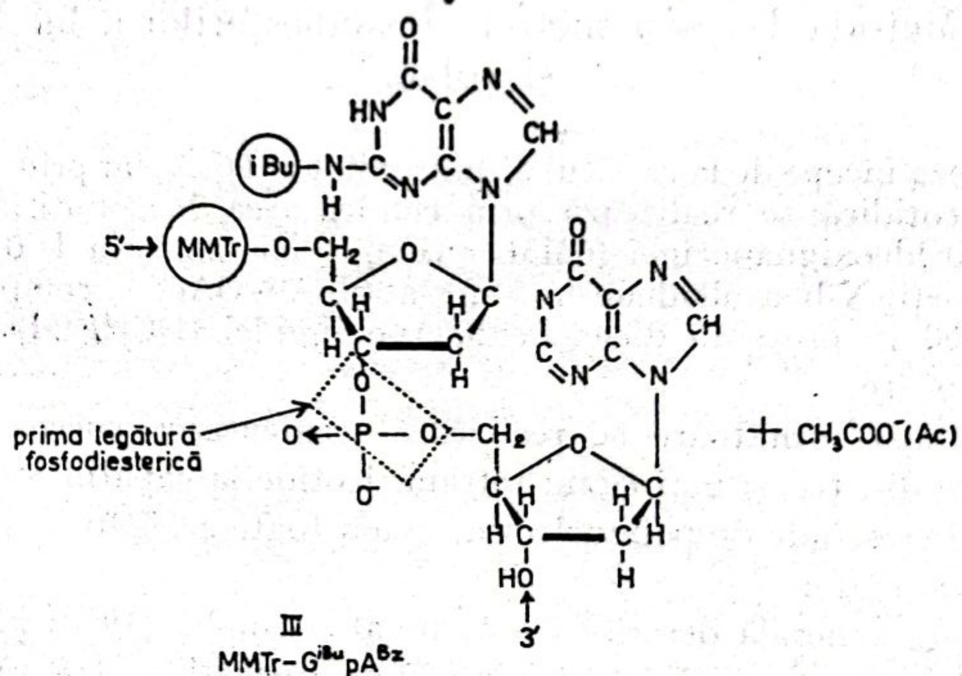
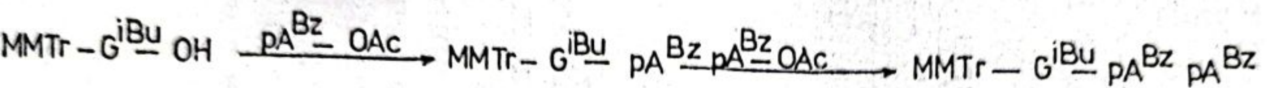
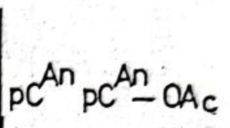
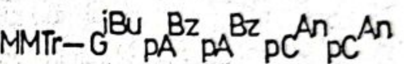
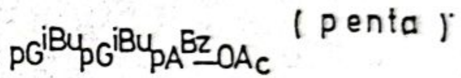


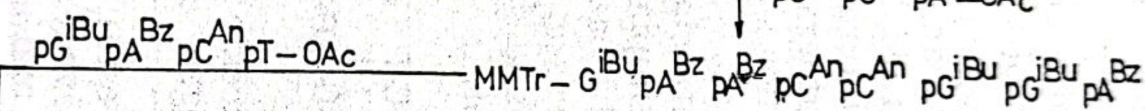
Fig. 60. Sinteza dinucleotidului $MMTr-G^{iBu}pA^{Bz}$ prin metoda preconizată de grupul lui *Khorana*. Grupările încercuite indică poziția în care s-a făcut protejarea.

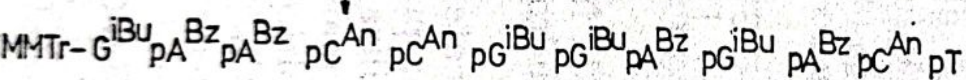




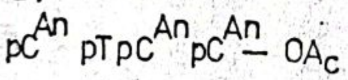


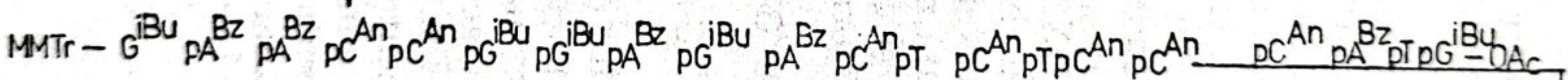




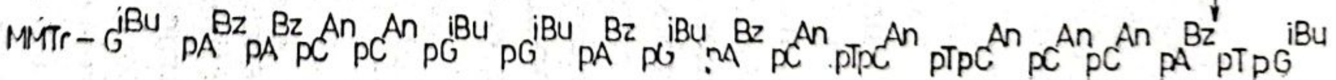


(d o d e c a)





(h e x a d e c a)

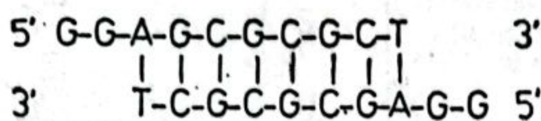


(i c o s a)

Așezarea literei p în stînga nucleozidului arată gruparea 5'-fosfat, iar în dreapta arată gruparea 3'-fosfat. După cum se observă, gruparea 5'-hidroxil a nucleozidului terminal este protejată cu gruparea monometoxitritil (MMTr), iar gruparea 3'-hidroxil cu acetil (OAc). Grupările funcționale ale bazelor heterociclice sînt protejate astfel: pentru guanină se folosește gruparea izobutiril (iBu), pentru adenină gruparea benzoil (Bz), iar pentru citidină gruparea anisoil (An).

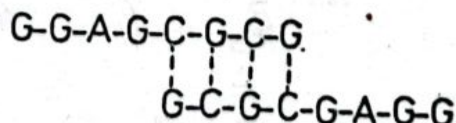
Randamentul de obținere a produșilor scade cu creșterea lungimii catenei, astfel că produșii finali se obțin cu randamente în general mici. Fiecare etapă de condensare este însoțită de purificarea minuțioasă a produsului obținut prin cromatografie pe coloană cu schimbători de ioni anionici. Structura produșilor este analizată prin cromatografie pe hîrtie, atît în forma care conține și grupările protectoare, cît și după îndepărtarea acestora. În faza finală a sintezei fiecărui segment de DNA purificarea s-a făcut cu ajutorul cromatografiei pe DEAE-celuloză în prezența ureei 7 M. Îndepărtarea sărurilor s-a făcut prin trecerea produsului pe coloane de „Bio-Gel".

Segmentele de DNA astfel obținute sînt monocatenare. Din ele se construiesc molecule bicatenare prin simpla amestecare a segmentelor de DNA construite astfel încît ele să aibă bazele complementare. Unele segmente însă, datorită particularităților secvențelor de nucleotide, sînt auto-complementare și formează ele însele direct structuri bicatenare, cum este cazul următorului decanucleotid:



Cu excepția a cîte două baze de fiecare parte a moleculei rămase neinteracționate prin legături de hidrogen, celelalte opt sînt angajate într-o structură bicatenară.

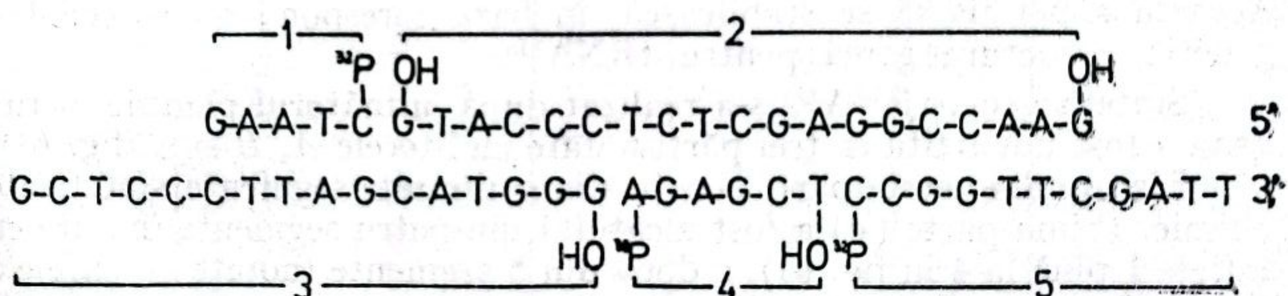
Uneori, formarea acestor segmente este nedorită pentru că împiedică obținerea secvenței dorite. Pentru a preveni sau a reduce auto-complementarea unor segmente se pot utiliza mai multe variante. Una dintre acestea este sinteza unui segment mai scurt și mărirea compensatorie a segmentului adiacent. De exemplu, prin reducerea decanucleotidului prezentat cu două nucleotide (TC), se va obține octanucleotidul cu următoarea structură secundară:



Structura secundară a segmentelor rezultate prin auto-complementaritate poate fi îndepărtată și prin încălzirea soluției lor, tratament în urma căruia legăturile de hidrogen dintre baze se rup.

VI.3.1.1. **Fosforilarea.** Segmentele de DNA sintetizate sînt în etapa următoare legate între ele. În acest scop ele sînt întîi fosforilate la capătul 5′, folosind polinucleotidkinaza *T4*. Fosforilarea este considerată terminată în momentul în care, după cicluri noi, încălzirea şi răcirea produsului şi tratarea lui cu kinază proaspătă nu are efect asupra reacţiei. Separarea segmentelor fosforilate de excesul de ATP marcat în poziţia γ (γ-^{32}P-ATP) se face prin trecerea amestecului de reacţie prin coloane de „Sephadex".

VI.3.1.2. **Ordonarea şi legarea segmentelor de DNA între ele.** Reacţiile de conectare (legare) a diferitelor segmente de DNA se desfăşoară în condiţii diferite de concentraţii de Mg^{2+} şi temperatură. În cazul particular al formării din 5 segmente de DNA conţinînd 5 pînă la 20 nucleotide a unei molecule de DNA avînd 25 de perechi de baze şi 9 nucleotide (4 de o parte şi 5 de cealaltă parte a moleculei) înlănţuite monocatenar, amestecul segmentelor de DNA se face într-o soluţie care conţine Tris-HCl 15 mM, ditiotreitol (DTT) 10 mM, ATP 6 μM şi fosfat de sodiu 2,5 mM. Soluţia se încălzeşte la 60°C timp de 30 minute, după care se adaugă $MgCl_2$ pentru a avea concentraţia de 10 mM. În urma acestui tratament, cele cinci segmente (notate cu 1 pînă la 5) se ordonează astfel încît molecula care rezultă are următoarea structură:



Segmentele interacţionează între ele pe baza principiului bazelor complementare, formînd compuşi de tip bicatenar avînd discontinuităţi în catene. Acestea sînt îndepărtate prin incubarea amestecului cu DNA-ligază. Enzima are proprietatea de a induce formarea legăturilor covalente între nucleotidul 5′-fosforilat terminal al unui segment şi nucleotidul 3′-hidroxilat terminal al segmentului adiacent. Legarea segmentelor se face în două etape. În prima se ordonează şi leagă segmentele 1—4, iar în a doua segmentul 5 se leagă de produsul anterior obţinut.

Produsul reacţiei de legare se separă de componentele neintrate în reacţie cu ajutorul coloanelor de „Agaroză" sau „Sephadex" şi este analizat prin trei metode diferite:

1) rezistenţa la fosfatază;

2) degradarea la 3′-nucleotide, folosind fosfodiesteraza de micrococ şi splină;

3) hidroliza cu deoxiribonuclează pancreatică și fosfodiesterază de venin pentru eliberarea 5'-nucleotidelor.

Produșii de hidroliză sînt analizați atît prin cromatografie pe hîrtie, cît și prin electroforeză la *p*H 3,5.

Eficiența legării între ele a diferitelor segmente este urmărită și prin măsurarea radioactivității specifice a capetelor fosforilate. În general, fosforilarea capetelor segmentelor care rămîn incluse în interiorul moleculei se face cu γ-^{32}P-ATP avînd o activitate specifică mică, iar fosforilarea capetelor care vor fi folosite pentru a realiza conexiuni cu alte fragmente mari de DNA se marchează cu γ-^{33}P-ATP cu activitate specifică ridicată. De asemenea, în scopul stabilirii proporției în care s-a realizat legarea fragmentelor de DNA, se fosforilează specific capetele lor: un fragment se fosforilează cu ^{32}P, iar al doilea cu ^{33}P. Urmărirea radioactivității specifice permite astfel stabilirea facilă a reacției de legare.

VI.3.1.3. **Prima sinteză chimică a unei gene.** Metodologia descrisă a fost elaborată în perioada anilor 1965—1970 de grupul lui Khorana și a culminat cu prima sinteză chimică totală a genei pentru tRNA^{Ala}, publicată în anul 1970 de Agarwal și colab. Autorii s-au fixat asupra sintezei acestei gene pentru că în anul 1965 singurul acid ribonucleic a cărui secvență totală a bazelor era cunoscută era aceea a tRNA^{Ala}. Aceasta a permis să se stabilească, în baza corespondențelor codului genetic, structura genei pentru tRNA^{Ala}.

Sinteza genei tRNA^{Ala} s-a realizat după următorul plan de lucru: gena a fost împărțită în trei părți notate cu literele *A*, *B* și *C* (fig. 61).

Fiecare din aceste părți consta din mai multe segmente sintetizate chimic. Prima parte (*A*) a fost alcătuită din patru segmente (notate cu cifrele **1** pînă la **4** în fig. 61), a doua din 5 segmente (notate cu cifrele **5** pînă la **9** în fig. 61), iar a treia parte din 6 segmente (notate cu numerele **10** pînă la **15** în fig. 61). Din aceste segmente s-au format întîi cele trei părți (*A*, *B* și *C*) ale genei prin metoda descrisă, iar în ultima fază a sintezei cele trei părți ale genei au fost legate între ele pentru a obține gena întreagă. Cum tRNA^{Ala} conține 77 de nucleotide, gena care controlează sinteza acestui tRNA conține 77 de perechi de baze.

Sinteza a început cu partea a doua (*B*) a genei. Segmentele **5**, **7** și **9** au fost fosforilate la capătul lor 5' cu γ-^{32}P-ATP și legarea segmentelor s-a făcut în următoarea ordine: întîi s-au amestecat segmentele **6**—**9**, iar după ce acestea au interacționat, s-a adăugat în amestecul de reacție segmentul **5**. Amestecul de reacție (0,84 ml) a conținut: 1,8 nmoli de segment **6**, 2,5 nmoli de segment **8**, 2,5 nmoli de segment **7** și 2,5 nmoli de segment **9**. Amestecul s-a făcut în tampon Tris—HCl (*p*H 7,7), 15 mM, DTT 10 mM, ATP 66 μM și 2,5 mM Na_2HPO_4. Amestecul s-a încălzit la 60°C timp de 3 min, iar apoi s-a adăugat $MgCl_2$ pentru a obține concentrația finală de 10 mM. Amestecul se păstrează 15 min la 15°C,

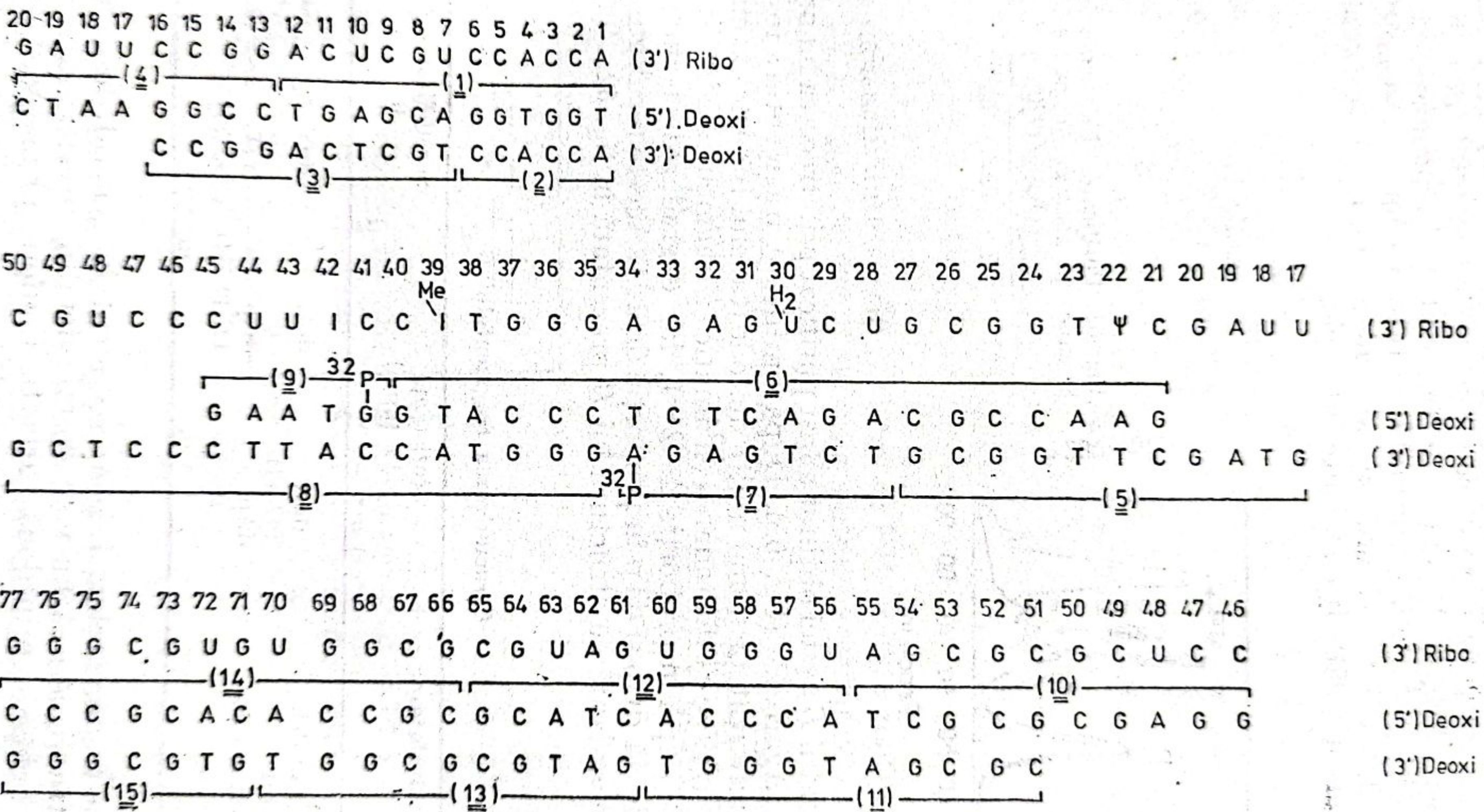


Fig. 61. Planul pentru sinteza genei tRNA^Ala (după *Agarwal* și colab. 1970)

după care se adaugă 250 unități de ligază. După o oră la 15°C, cînd reacția a atins un platou, amestecul s-a încălzit la 100°C pentru 2 min după care s-a adăugat 3,5 nmoli de segment **5**. Preincubarea amestecului timp de 20 min la 25°C urmată de tratarea lui cu 150 unități de DNA-ligază a realizat întîi ordonarea segmentului **5** la restul moleculei și apoi formarea legăturii covalente între ele.

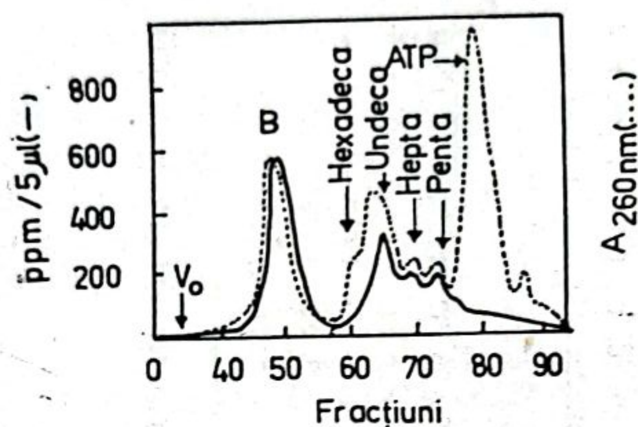


Fig. 62. Purificarea fragmentului *B* pe coloană de agaroză (după *Agarwal* și colab., 1970).

Fragmentul *B* astfel obținut a fost purificat prin trecerea lui printr-o coloană de „Agaroză" (fig. 62). După purificare, fragmentul a fost analizat și caracterizat prin mai multe metode (tabelul 16). Din examinarea acestui tabel reiese că degradarea enzimatică a fragmentului în 5'-nucleotide dă dpC și dpA în proporție de 2: 1, iar degradarea enzimatică în 3'-nucleotide dă dGp și dTp în proporție de 2: 1. Aceste rezultate sînt în perfectă concordanță cu structura lui *B* prezentată în fig. 62.

Tabelul 16

Caracterizarea fragmentului B

Acțiunea fosfatazei	Rezistență 1113 (ppm)		Sensibilitate 0	
Analiza 5'-nucleotidelor (^{32}P pp 5 min)	dpA 747 (1)	dpG 0	dpT 0	dpC 1457 (1,9)
Analiza 3'-nucleotidelor	dAp 0	dGp 12 30(2,1)	dTP 595 (1)	dCp 0

Sinteza fragmentelor *A* și *C* s-a făcut în general după modelul arătat pentru *B*, așa că nu vom descrie detaliile acestei sinteze. Gena întreagă s-a obținut prin două variante. Conform primei variante, *B* a fost legat de *C*, obținîndu-se produsul *B* + *C*, de care s-a legat apoi fragmentul *A*. În a doua variantă, pe care o prezentăm în continuare,

s-a legat întîi *A* cu *B*, obținîndu-se produsul *A* + *B*, de care apoi s-a legat fragmentul *C*.

Obținerea fragmentului A + B. Urmărirea legării lui *A* de *B* a fost facilitată de marcarea specifică puternică a lui *B* cu ^{33}P și a lui

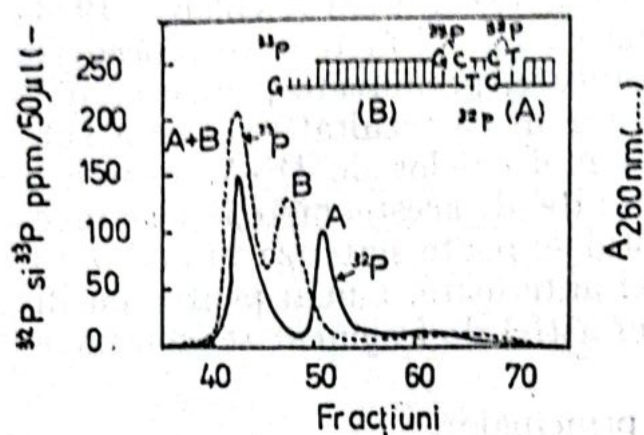


Fig. 63. Sinteza și purificarea lui *A*+*B* (modificat după *Agarwal* și colab., 1970).

A cu radioactivitate specifică slabă cu ^{32}P. Randamentul de legare a lui *A* cu *B* a fost de 60%; detaliile sintezei și purificării sînt date în fig. 63.

Obținerea genei prin legarea părților A + B de C. Fragmentul *A* + *B* obținut în etapa anterioară a fost cuplat cu fragmentul *C* prin intermediul segmentului **10**. Condițiile de legare, precum și modul de purificare a genei totale sînt prezentate în fig. 64.

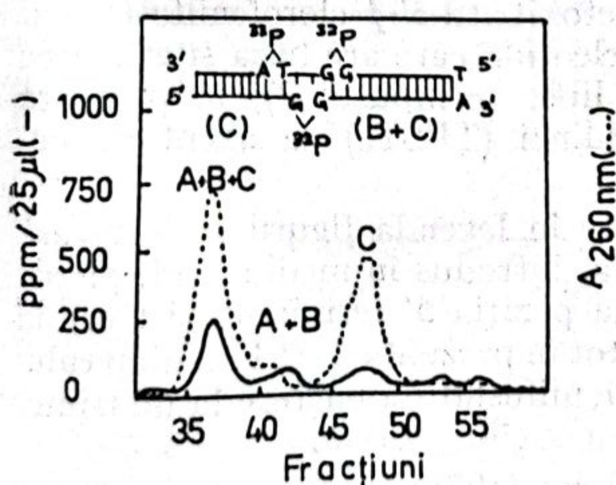


Fig. 64. Sinteza și purificarea genei tRNA^{Ala} din fragmentele de DNA *A*, *B* și *C* prin cuplarea compusului *A*+*B* cu *C*, prin intermediul segmentului **10**.

Primul maxim conține gena totală, al doilea — *A* + *B* neintrat în reacție, iar ultimul — excesul de *C*. Testul cu fosfatază, degradarea enzimatică la 5'-nucleotide și la 3'-nucleotide, au arătat că produsul obținut este o moleculă de DNA bicatenară, continuă, conținînd 77 de perechi de baze corespunzătoare genei întregi a tRNA^{Ala}.

VI.3.2. Metoda a II-a sau metoda fosfotriesterică a lui Itakura şi colab.

În ultimii ani (1977 şi 1978) grupul de cercetători condus de Itakura a pus la punct o metodă nouă şi rapidă de sinteză chimică a DNA cu secvenţa bazelor dorită (Itakura şi colab., 1977; Crea şi colab., 1978; Hirose, Crea şi Itakura, 1978). Îmbinarea acestei metode cu procedeele cromatografice noi cu performanţe ridicate, promovate pentru analiza şi purificarea fragmentelor de DNA, a avut ca rezultat reducerea substanţială a timpului necesar sintezei moleculelor de DNA. Pentru a scoate în evidenţă performanţele deosebite ale acestei metode vom menţiona că un hexadecadeoxiribonucleotid se poate sintetiza în mai puţin de o săptămînă. Or, în cazul metodei anterioare, numai pentru purificarea pe coloană de „Agaroză" a unui astfel de fragment se consumau peste 30 de ore.

Metoda cuprinde trei momente principale:

a) sinteza trimerilor cu secvenţa bazelor prestabilită;

b) cuplarea trimerilor între ei pentru obţinerea de oligonucleotide cu secvenţa bazelor dorită;

c) legarea cu DNA ligază a oligonucleotidelor între ele, pentru a obţine genele de interes.

VI.3.2.1. **Sinteza trimerilor protejaţi.** Trimerii sau blocurile de codoni sînt unităţile de bază din care se construiesc oligonucleotidele. Etapele principale ale sintezei unui trimer sînt prezentate în fig. 65. Sinteza începe prin cuplarea 5'-O-dimetoxitritil-3'-*p*-clorofenilfosfatului (compusul **1** din fig. 65) cu a doua nucleotidă care are baza şi gruparea fosforică protejată, iar hidroxilul 5' liber (compusul **2**), în prezenţa 2,4,6-triizopropilbenzensulfoniltetrazolidinei (TPSTe) ca agent de cuplare.

În condiţiile experimentale arătate în legenda figurii se formează un dimer protejat (compusul **3**). Acesta, introdus în mediu acid, pierde gruparea sa dimetoxitritil (DMT) de la poziţia 5' terminală şi trece în dimerul 5'-OH (compusul **5**). Cuplarea tot în prezenţa TPSTe a dimerului 5'-OH cu 5'-O-dimetoxitritil-3'-*p*-clorofenilfosfat dă naştere la un trimer total protejat.

Într-o lucrare recentă Crea şi colab. (1978) precizează că randamentul de sinteză a trimerilor este mai bun dacă sinteza monomerilor total protejaţi se face din derivaţi nucleozidici cu un nou agent de fosforilare monofuncţional, care este *p*-clorofenil-β-cianoetilfosforoclorură. Acesta, în soluţie de acetonitril, în prezenţa 1-metilimidazolului şi a derivatului nucleozidic, determină sinteza mononucleotidului total protejat care este: 5'-O-dimetoxitritil-3'-*p*-clorofenil-β-cianoetilfosfatul.

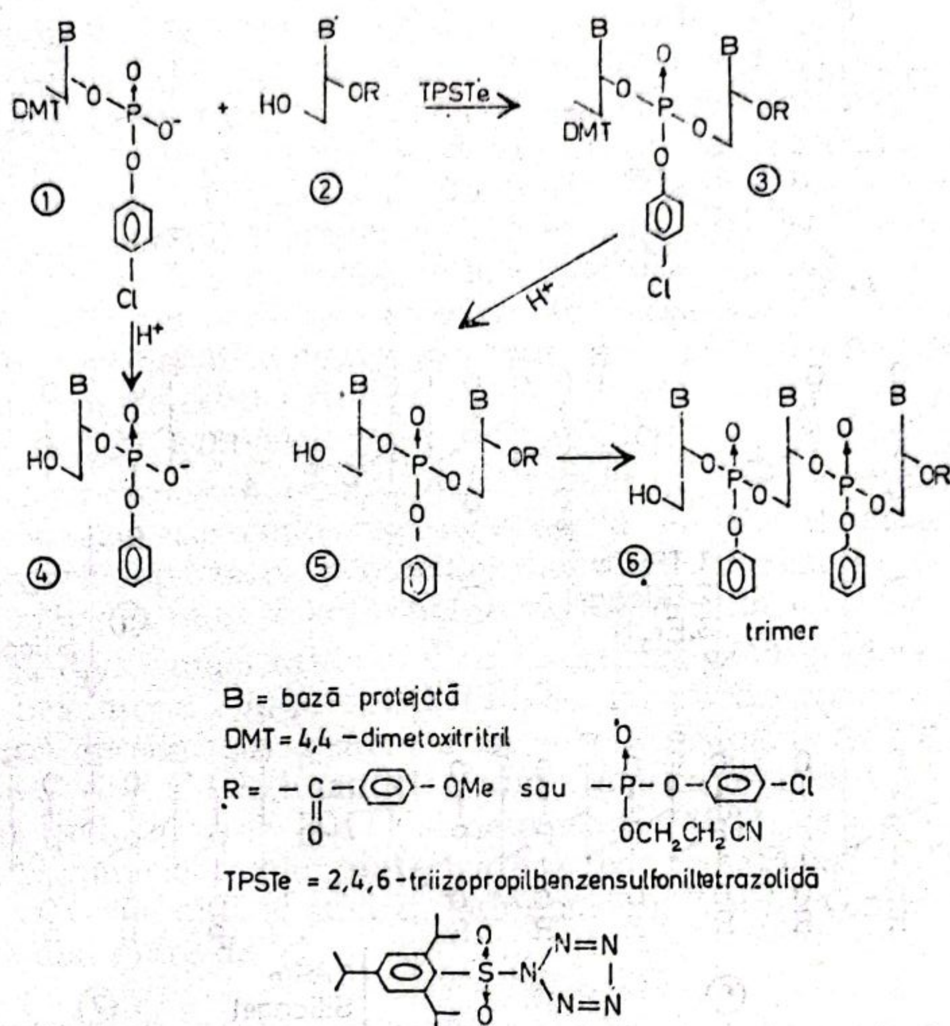


Fig. 65. Sinteza trimerilor. Sinteza începe prin cuplarea compusului **1** cu compusul **2** în prezența puternicului agent de cuplare TPSTe, obținîndu-se dimerul **3**. Prin tratarea amestecului cu acid benzensulfonic (2%), dimerul **3** trece în dimer 5′-OH, **5**, prin pierderea grupării 5′-protectoare. Blocul de trimer total protejat s-a preparat din dimerul 5′-OH, **5**, și din monomerul **1** în prezența TPSTe.

Prin această metodă se poate sintetiza o mare varietate de trimeri avînd diferite secvențe ale bazelor. Pentru construirea genelor insulinei, de exemplu, a fost necesară sinteza a 45 de trimeri diferiți.

VI.3.2.2. **Obținerea oligonucleotidelor.** Trimerii obținuți prin metoda prezentată constituie, așa cum s-a arătat anterior, „blocurile de construcție" din care se alcătuiesc oligonucleotidele. La baza sintezei unui oligonucleotid care conține 12 nucleotide, de exemplu (fig. 66), stau două tipuri de trimeri: unul bifuncțional (compusul **1**) și un trimer 3′-terminal (compusul **2**). Trimerul bifuncțional **1** tratat cu un amestec de piridină: trietilamină: apă (3: 1: 1) este hidrolizat la fosfodiesterul

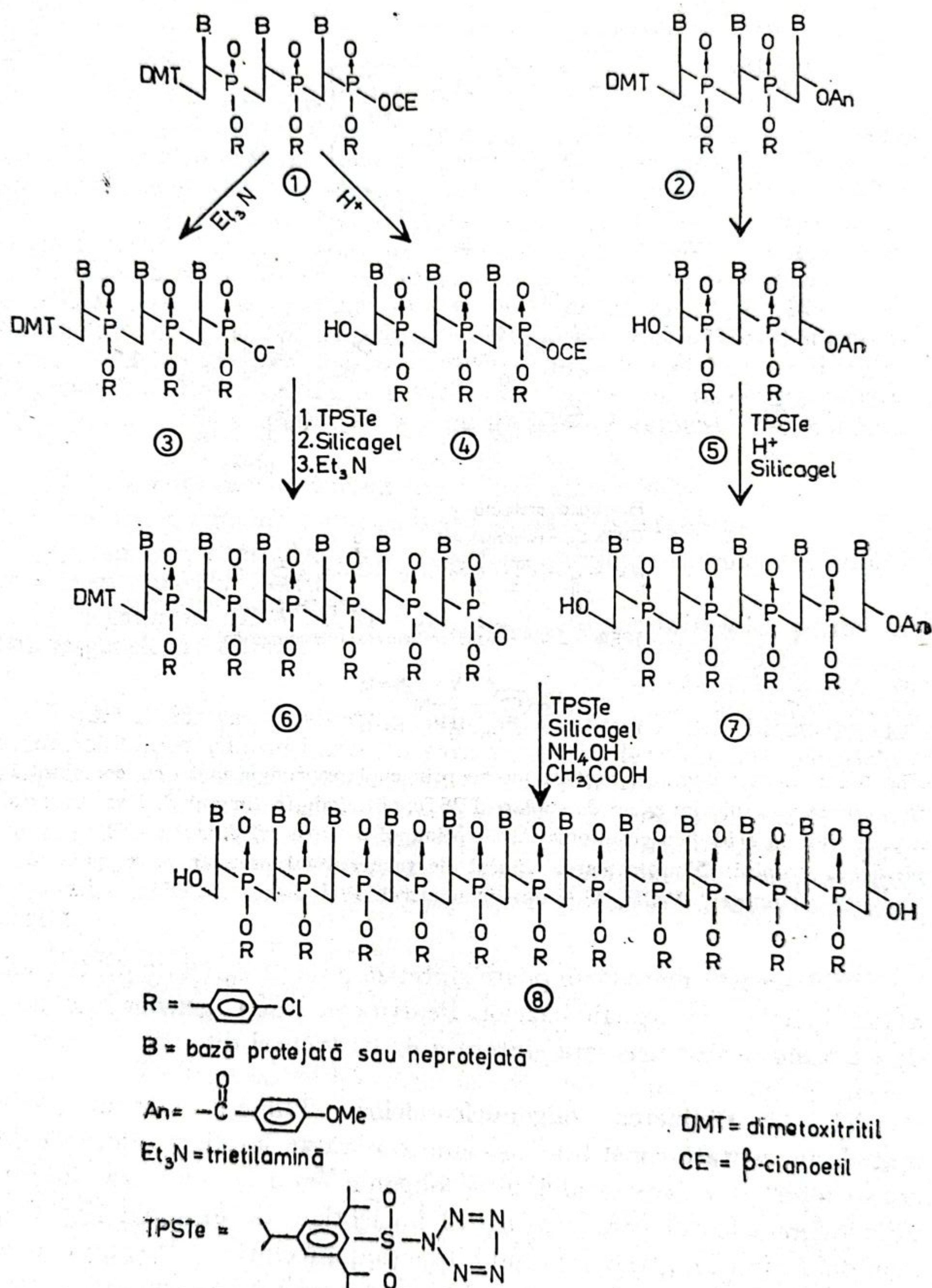


Fig. 66. Sinteza chimică a oligonucleotidelor (după *Crea* și colab., 1978).

3′ (compusul **3**), iar acesta pus în contact cu acidul benzensulfonic 2% trece în compusul **4**, care are capătul 5′ neprotejat.

Trimerul 3′-terminal **2**, avînd la capătul 3′-terminal o grupare protectoare anisoil, tratat tot cu acid benzensulfonic 2% pierde gruparea DMT protectoare de la capătul 5′, dînd naștere la compusul **5**. Gruparea 5′-OH a acestuia, fiind liberă, el poate fi cuplat cu un trimer 3′-fosfodiesteric (compusul **3**) în prezența 2,4,6-triizopropilbenzensulfoniltetrazolidinei (TPSTe) pentru a obține hexamerul **7**. Trecerea lui **7** peste o coloană de silicagel permite îndepărtarea excesului de trimer 3′-fosfodiesteric 3. Menționăm că pentru obținerea lui **7** compusul **3** este introdus în exces (cantitate echivalentă cu 1,5 M) față de compusul **5** (numai în proporție de 1 M echivalent).

Al doilea hexamer **6**, se obține din trimerii **3** și **4** în prezența TPSTe, printr-o strategie asemănătoare utilizată la sinteza hexamerului **7**. Și în acest caz îndepărtarea produșilor neintrați în reacție se face prin trecerea amestecului de reacție pe o coloană de silicagel.

Sinteza dodecanucleotidului **8** se realizează prin cuplarea hexamerului **6** cu hexamerul **7** în prezența TPSTe, iar purificarea lui se face tot prin coloană de silicagel. Pentru a îndepărta grupările protectoare de la capetele 3′ și 5′ ale dodecanucleotidului acesta este tratat cu NH_4OH concentrat (îndepărtarea DMT) și acid acetic 80% (îndepărtarea An). Puritatea oligonucleotidelor sintetizate a fost testată prin electroforeză în gel de poliacrilamidă și analiza bidimensională a secvenței și în general ea este mai mare de 95%.

VI.3.2.3. **Legarea oligonucleotidelor între ele.** Odată ce oligonucleotidele au fost sintetizate ele sînt întîi marcate cu (γ-^{32}P)ATP cu ajutorul polinucleotidkinazei *T4* și apoi legate între ele enzimatic cu ajutorul DNA-ligazei *T4*, în ordinea dorită. Pentru sinteza chimică a genei somatostatinei s-au sintetizat și legat opt oligonucleotide specifice, în timp ce sinteza genelor insulinei umane a necesitat sinteza a 29 de oligonucleotide diferite. Modurile în care s-a sintetizat chimic gena somatostatinei din cele opt oligonucleotide, și în care a fost introdusă această genă într-un vehicul plasmidic sînt descrise în cele ce urmează.

*

Odată cu apariția metodei triesterilor a lui Itakura, sinteza polinucleotidelor a intrat într-o fază nouă. S-a deschis calea producerii de gene active biologic într-un timp relativ scurt și cu un randament ridicat. Obținerea chimică a genelor, împreună cu tehnologia DNA recombinant oferă astfel posibilitatea de a construi molecule specifice de DNA (pasageri) capabile să dirijeze sinteza unor proteine, hormoni, enzime etc., de mare interes medical și economic.

Progresele în acest domeniu sînt de-a dreptul extraordinare. La începutul anului 1981 (28 ianuarie) agenţiile de presă au anunţat realizarea primelor procedee total mecanizate şi automatizate de „fabricare a genelor". Este suficient să oferi unei instalaţii proiectul genei ca aceasta să-ţi livreze gena dorită. Fără îndoială că această realizare va permite o dezvoltare vertiginoasă a ingineriei genetice transformînd radical viaţa omului.

VI.3.2.4. **Sinteza chimică a genei somatostatinei.** Somatostatina este un hormon peptidic construit din 14 acizi aminaţi. Ea a fost descoperită de Guillemin în extractele de hipotalamus obţinute de la oaie, performanţă pentru care autorul a primit Premiul Nobel pentru fiziologie şi medicină. Ulterior ea a fost pusă în evidenţă şi în alte ţesuturi, precum şi la alte specii de animale (Vale şi colab., 1976).

Rolul somatostatinei în organismul mamiferelor este acela de a inhiba secreţia mai multor hormoni, cum este hormonul de creştere, insulina şi glucagonul. Datorită acestei proprietăţi, somatostatina este tot mai mult socotită ca un agent terapeutic eficace în tratamentul acromegaliei, al pancreatitei acute şi, în special, al diabetului insulinodependent. Atît izolarea somatostatinei din extractele de hipotalamus sau din alte ţesuturi, cît şi sinteza ei directă din acizi aminaţi sînt foarte dificile şi costisitoare. Pentru acest motiv preţul ei este foarte ridicat, iar cantităţile care se pot obţine pe aceste căi sînt limitate.

Tehnologia DNA recombinant a oferit însă o soluţie ingenioasă şi avantajoasă pentru producerea somatostatinei. Ea constă în introducerea genei pentru somatostatină, sub formă de pasager, într-o plasmidă adecvată (ca vehicul), care se multiplică şi exprimă gena într-o cultură bacteriană.

Dacă alegerea vehiculului adecvat nu ridică probleme speciale, sinteza genei este mult mai dificilă. Progresele realizate însă în ultimii doi ani în ceea ce priveşte sinteza chimică a genelor au făcut ca accesul către pasager să fie tot mai uşor de realizat. Într-adevăr, lucrările foarte recente ale lui Itakura şi colab. (1977) şi Crea şi colab. (1978) probează din plin valabilitatea acestei afirmaţii. Autorii menţionaţi au reuşit mai întîi să sintetizeze chimic gena pentru somatostatină, iar apoi sinteza — tot chimică — a genelor insulinei. În acest fel s-au pus bazele sintezei chimice rapide a pasagerilor.

Strategia folosită atît pentru sinteza genei somatostatinei, cît şi pentru genele insulinei este în general aceeaşi, motiv pentru care vom descrie numai modul de sinteză a genei somatostatinei. În plus, alegerea somatostatinei ca model a fost determinată şi de faptul că gena somatostatinei este foarte mică în comparaţie cu aceea a insulinei, ceea ce permite urmărirea mai facilă a modului ei de sinteză.

A. *Structura genei somatostatinei.* Analiza chimică a somatostatinei pure a stabilit că ea este un polipeptid mic constituit din numai 14 acizi aminaţi. Cercetările realizate în anul 1973 de Brazeau şi colab. în laboratorul lui Guillemin au reuşit să determine secvenţa acizilor aminaţi din somatostatină. Odată ce această secvenţă era cunoscută, structura genei a fost dedusă în baza echivalenţelor stabilite de codul genetic.

Deci, structura somatostatinei fiind:

H_2N-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-OH

structura genei sale devine:

GCT GGT TGT AAG AAC TTC TTT TGG GAA TCA CTT TCA GCT TGT
CGA CCA ACA TTC TTG AAG AAA ACC CTT AGT GAA AGT CGA ACA

Trebuie precizat că pentru secvenţa celor 14 acizi aminaţi se pot prezice şi alte structuri ale genei, codul fiind degenerat (unul şi acelaşi acid aminat poate fi codificat de mai mulţi codoni). Ca atare, secvenţa aleasă mai sus este oarecum arbitrară. Totuşi, alegerea secvenţei arătate a fost motivată de mai multe fapte, printre care amintim: *a*) cercetările anterioare efectuate cu genom de bacteriofag MS_2 au precizat preferinţa sistemului celular de *E. coli* de a exprima într-un mod specific codoni, mod ce a fost luat în considerare; *b*) s-a evitat — pe cît a fost posibil — situaţia de a avea secvenţe bogate în AT, deoarece acestea induc de regulă terminarea transcrierii.

B. *Strategia sintezei.* Pentru a obţine gena somatostatinei, capabilă de a fi introdusă ca pasager într-un vehicul, era necesar ca planul de lucru să ţină seama de următoarele condiţii esenţiale:

a) să se sintetizeze pe cale chimică oligonucleotide a căror secvenţă să corespundă cu secvenţa diferitelor părţi ale genei şi care prin „sudare" să realizeze unitatea structurală a celor 14 codoni caracteristici genei somatostatinei;

b) oligonucleotidele să fie astfel alese încît să elimine împerecherea nedorită inter- şi intramoleculară a nucleotidelor;

c) în scopul facilitării inserţiei genei în vehicul, capetele 5′ să fie monocatenare, iar secvenţa bazelor de la un capăt 5′ să fie identică cu aceea pe care o generează enzima de restricţie Eco *R*I, iar secvenţa de la al doilea capăt 5′ să aibă secvenţa bazelor identică cu aceea pe care o generează enzima de restricţie Bam *H*I;

d) capătul amino al somatostatinei să fie precedat de un codon pentru metionină, iar capătul —COOH să fie urmat de doi codoni *nonsens.*

Avînd în vedere cele arătate mai sus, proiectul a prevăzut sinteza genei din opt oligonucleotide diferite. Cele opt oligonucleotide sînt notate în fig. 67, cu literele *A*—*H*, iar lungimea lor este cuprinsă între

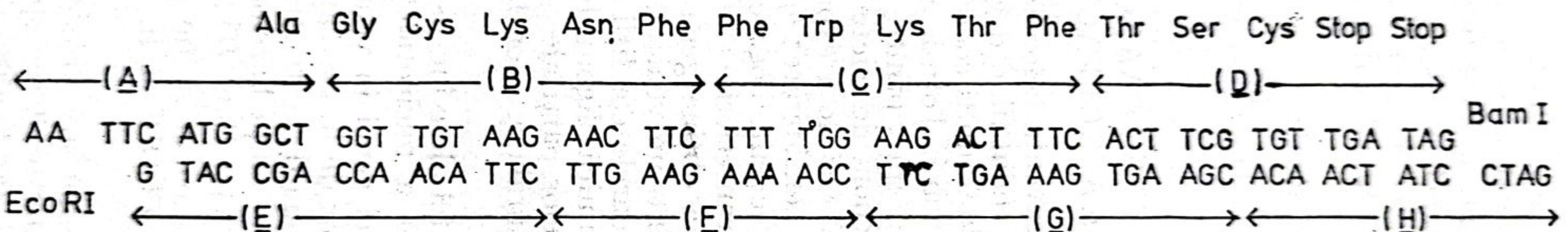


Fig. 67. Sinteza chimică a genei somatostatinei. Rîndul de sus prezintă secvența acizilor aminați din somatostatină. Rîndul al doilea și al treilea prezintă structura genei somatostatinei, dedusă din secvența acizilor aminați. Structura cuprinde în plus față de gena somatostatinei un codon (nucleotidele **6, 7, 8** de la capătul 5′ din stînga) pentru metionină, doi codoni nonsens (notați cu „stop" în partea dreaptă a figurii), precum și capetele monocatenare cu secvența nucleotidelor specifică locului de recunoaștere pentru enzimele de restricție Eco *R*I (capătul 5′ din stînga) și Bam *H*I (capătul 3′ din dreapta). Literele *A—H* indică cele opt oligonucleotide sintetizate pentru a construi gena întreagă.

11—16 nucleotide. Aceste oligonucleotide au fost astfel proiectate ca fiecare dintre ele să conţină cel puţin cinci nucleotide complementare cu nucleotidele corespondente din partea interacţionată, pentru a asigura un randament bun legării lor de către DNA-ligază. Oligonucleotidele au fost sintetizate chimic prin metoda triesterică prezentată anterior. După sinteză ele au fost marcate cu (γ-^{32}P)ATP în prezenţa polinucleotidkinazei şi apoi legate între ele cu DNA-ligază din *T4*.

Gena rezultă din autoasamblarea moleculei, datorită formării legăturilor de hidrogen între perechile de baze complementare. Uneori se produce şi polimerizarea moleculelor datorită capetelor coezive ale moleculelor. În final, produşii reacţiei de legare s-au tratat cu enzimele de restricţie Eco *R*I şi Bam *H*I pentru a genera gena somatostatinei prezentată în fig. 66. Odată terminată sinteza genei, ea poate fi introdusă într-un vehicul pentru a obţine un DNA recombinant.

VI.4. Pregătirea unor pasageri pentru inserţia în vehicul

Enzimele de restricţie acţionează numai la nivelul anumitor secvenţe specifice din moleculele bicatenare de DNA. În tabelul 1 s-a arătat care sînt secvenţele recunoscute de principalele enzime de restricţie, precum şi modul cum se produce scindarea în interiorul secvenţei. O serie de enzime de restricţie cum sînt Eco *R*I, Bam I şi Hin*d* III, prin scindare, dau naştere la capete coezive, iar altele, cum sînt Alu I şi Hae III, la capete netede. Molecula de DNA fragmentată de aceste enzime de restricţie poate fi refăcută, adică capetele fragmentului pot fi legate din nou covalent, dacă sînt incubate în prezenţa DNA-ligazei *T4*.

Uneori fragmentarea unui DNA se face însă întîmplător, fără intervenţia unei enzime de restricţie. În acest caz capetele fragmentelor nu au secvenţele nucleotidelor cunoscute. Aceeaşi situaţie se întîlneşte şi la moleculele de DNA sintetizate de reverstranscriptază. Pentru ca aceste fragmente sau molecule de DNA să poată fi manipulate cu uşurinţă în scopul inserţiei lor în anumite poziţii din vehicul — poziţii care, în general, au fost create tocmai prin scindarea vehiculului cu o enzimă de restricţie — la capetele lor se leagă secvenţe de nucleotide specifice, sintetizate chimic. Aceste fragmente conţinînd un număr de zece perechi de baze, denumite decameri, au fost astfel sintetizate încît în interiorul lor există situsul de recunoaştere al unei sau mai multor enzime de restricţie. În fig. 68 se prezintă structura a trei astfel de decameri sau, cum li se mai spune, *linkeri* sintetizaţi de Scheller şi colab. (1977).

După cum rezultă din figură cei trei decameri, atașați capătului unui fragment sau moleculă de DNA, pot fi utili pentru a crea situsuri de clivare specifice pentru următoarele enzime de restricție: Eco *R*I, Hpa II, Bam I, Hin*d* III și Alu I.

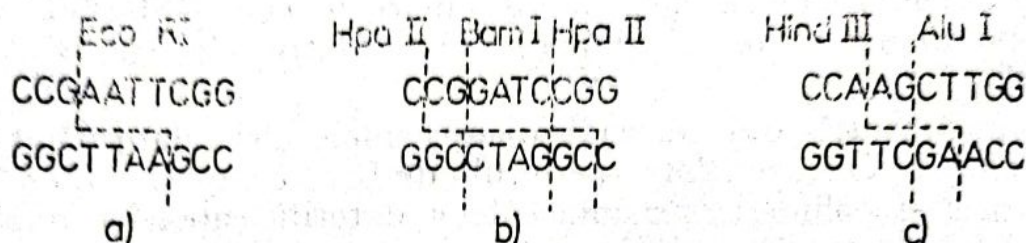


Fig. 68. Structura celor trei decameri (a, b, c) sintetizați de *Scheller* și colab. (1977) și modul lor de scindare de către enzimele de restricție menționate.

Modul de lucru cu decamerii implică parcurgerea următoarelor etape: *a*) sinteza chimică a decamerilor prin metoda fosfotriesterilor a lui Itakura (metodă descrisă la sinteza chimică a pasagerilor); *b*) legarea cîte unui decamer la cele două capete netede ale pasagerului cu ajutorul DNA ligazei *T4*; *c*) tratarea complexului rezultat cu aceeași enzimă de restricție care va fi folosită și la deschiderea vehiculului, în acest fel formîndu-se la pasager capete coezive, care sînt identice cu

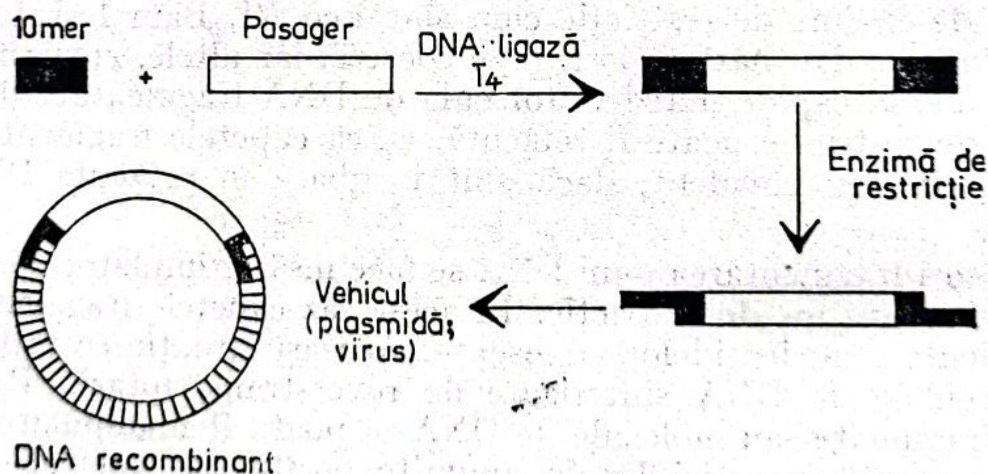


Fig. 69. Prezentarea schematică a utilizării decamerilor sintetizați chimic pentru construirea de DNA recombinant (modificat după *Scheller* și colab., 1977).

cele ale vehiculului și *d*) amestecarea pasagerului cu vehiculul „deschis" cu enzima de restricție corespunzătoare. Urmează în continuare procedeele obișnuite de transformare și clonare a celulelor. În fig. 69 sînt prezentate schematic etapele descrise anterior.

VI.5. Principii generale de exprimare a genelor-pasager

VI.5.1. Exprimarea genelor eucariote (pasager) în bacterii

Există cel puţin două diferenţe principale între semnalele genetice necesare exprimării genelor procariote şi eucariote. Prima constă în specificitatea secvenţelor care dirijează legarea directă a RNA polimerazei de DNA şi iniţierea transcrierii sau, cu alte cuvinte, în natura promotorului. Semnalele promotorului eucariot — cu toate că natura lui nu a fost încă descifrată — nu funcţionează în bacterii. A doua diferenţă se situează la nivelul semnalelor care dirijează traducerea mRNA în proteine.

După cum arată Steitz (1979), în cazul mRNA eucariot singura secvenţă necesară pentru legarea mRNA de ribozomul eucariot şi pentru iniţierea traducerii este codonul AUG, care codifică metionina de la capătul NH_2-terminal şi care este de fapt primul triplet al mesajului. Alături de acest codon, în unele cazuri s-a semnalat şi existenţa unor modificări posttranscripţionale în imediata vecinătate a capătului 5′ al transcriptului.

Spre deosebire de această situaţie, mRNA procariot trebuie să conţină în afară de AUG şi secvenţele care determină legarea lui eficientă de ribozom, precum şi iniţierea traducerii (Shine şi Dalgarno, 1975). Autorii au arătat că aceste secvenţe sînt formate din 3 pînă la 12 perechi de baze situate în regiunea capătului 5′ al mRNA care nu este tradus. Mai exact, ele sînt localizate în sensul invers citirii informaţiei, cu 3 pînă la 11 nucleotide înaintea codonului iniţiator AUG. Secvenţele acestea sînt cunoscute în literatură sub denumirea de secvenţe Shine-Dalgarno sau, pe scurt, secvenţe SD — după numele descoperitorilor lor. O caracteristică a secvenţelor SD este aceea că ele sînt complementare capătului 3′ al rRNA 16S. Datorită acestei proprietăţi secvenţele SD formează un complex duplex cu rRNA 16S, stabilizînd complexul de iniţiere format între mRNA şi ribozom. Prin urmare, acei RNA care sînt lipsiţi de secvenţele SD nu sînt eficient traduşi de sistemul de traducere al bacteriei.

Ca atare, o genă eucariotă se va exprima eficient şi corect într-o celulă bacteriană numai atunci cînd ea va fi transcrisă de un promotor bacterian care posedă secvenţele SD în poziţia corectă.

Pentru a satisface această condiţie, în general se fuzionează fragmentul de DNA care codifică promotorul şi transcriptul conducător *(leader)* al unei gene bacteriene cu fragmentul de DNA care conţine gena eucariotă. În urma acestei fuziuni rezultă un mRNA care conţine secvenţa SD din gena procariotă şi codonul iniţiator AUG al genei eucariote.

Guarente, Roberts şi Ptashne (1980) au propus ca sursă de promotor şi secvenţă SD un fragment de DNA conţinînd o parte din operonul

lac și anume promotorul, zona *lac Z* și secvențele SD. Acest fragment se termină cu două perechi de baze înaintea codonului inițiator ATG al zonei *lac Z*. Promotorul poartă o mutație care îl face funcțional în absența proteinei CAP *(catabolite gene action protein)* și adenozinmonofosfatului ciclic necesare stimulării acestui promotor. În plus, fragmentul mai conține și operatorul *lac* locul asupra căruia acționează

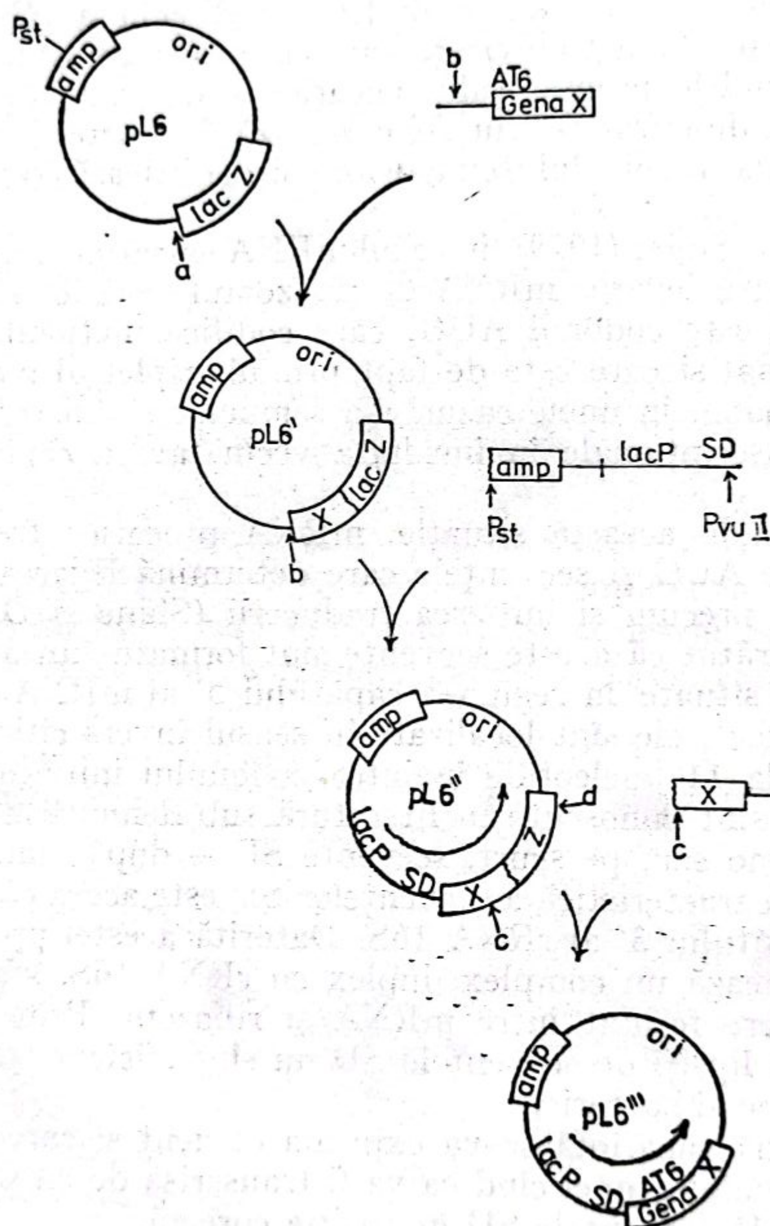


Fig. 70. Metoda generală de optimizare a exprimării unei gene eucariote în *E. coli* (după *Guarente, Roberts* și *Ptashne*, 1980).

represorul *lac* pentru a controla promotorul. Pentru acest motiv sinteza proteică este sub controlul promotorului și poate fi reglată de inductori ai operonului *lac* de tipul izopropiltiogalactozidului.

Metoda se bazează pe utilizarea unor plasmide special construite de tipul plasmidei pLG (fig. 70), care poartă o parte din gena *lac Z*

a bacteriei *E. coli*. Fragmentul de genă *lac Z* codifică o mare parte din porţiunea —COOH terminală a β-galactozidazei, activă din punct de vedere enzimatic.

În prima etapă, gena eucariotă X este fuzionată cu plasmida pLG în locul determinat de situsul enzimei de restricţie *a*, obţinîndu-se gena fuzionată X'-Z şi plasmida pLG.

În a doua etapă, plasmida pLG' este deschisă cu enzima de restricţie *b*, iar plasmida liniară rezultată este redusă cu ajutorul unor nucleaze în aşa fel ca promotorul *lac* şi secvenţele SD să ajungă în apropierea codonului ATG care codifică metionina NH_2-terminală a proteinei X. Trebuie precizat că uneori plasmidele care au promotorul în poziţia optimă (cum este plasmida pLG") sînt capabile de a dirija sinteza proteinei fuzionate active enzimatic: proteina X-galactozidază. Această proteină începe cu metionina NH_2-terminală a proteinei X. Ele sînt recunoscute prin transformarea bacteriilor lac^- în bacterii lac^+.

În ultima etapă, plasmidele producătoare de proteine fuzionate sînt izolate, iar gena eucariotă se reconstituie prin scindarea cu enzime de restricţie (*c*, *d* şi *e*) care acţionează în zona genelor X şi *lac Z*.

VI.5.2. Exprimarea genelor procariote (pasager) în celulele mamiferelor

Introducerea unei gene procariote în genomul unei celule eucariote are o importanţă fundamentală, în principal prin perspectiva pe care o oferă pentru vindecarea unor maladii ereditare. Reuşita acestei operaţii depinde atît de cunoaşterea modului de organizare a genelor eucariote, cît — mai ales — de lămurirea mecanismelor care intervin în exprimarea lor.

În ultimii ani s-au făcut progrese remarcabile în cunoaşterea structurii intime şi a modului de organizare a genelor celulelor mamiferelor şi a altor organisme eucariote. Astfel, Fritsch şi colab. (1980) au reuşit să determine secvenţa nucleotidelor a locusului cromozomal pentru întregul *cluster* de gene responsabile de sinteza β-globulinei. Cum acest locus conţine aproximativ 65 Kbp se poate uşor aprecia impresionantul salt realizat în acest domeniu.

Pentru a scoate şi mai mult în evidenţă realizarea grupului condus de Fritsch, se va preciza că stabilirea secvenţelor bazelor genomului virusului SV40 care conţine 5,3 Kbp, publicată în anul 1978 de Fiers şi colab. şi independent de Reddy şi colab., a fost considerată o mare performanţă.

Totuşi, în ciuda progresului evident realizat în cunoaşterea anatomiei moleculare a unor gene ale organismelor superioare, detaliile modului lor de reglare şi exprimare în cursul creşterii şi dezvoltării

celulelor mamiferelor, nu sînt încă cunoscute. S-a constatat că nu este suficient să se stabilească structura primară a unei gene pentru a cunoaște modul în care ea se exprimă. De exemplu, din datele de secvența a α și β-globulinelor nu se poate înțelege de ce primele se exprimă numai în perioada fetală, iar ultimele în aceea a adultului.

Pentru a studia activitatea biologică a genelor în celulele mamiferelor, încă din 1972 s-a făcut uz de virusul SV40 ca vector (Jackson, Symons și Berg). Acesta s-a dovedit a fi un mijloc util pentru caracterizarea stării fizice, pentru exprimarea și reglarea noilor gene în celulele de mamifere.

S-a ales virusul SV40 pentru a media transferul de gene întrucît minicromozomul său se propagă vegetativ se integrează stabil în genoamele celulelor gazdă. Alegerea a fost motivată și de faptul că genele virusului și funcțiile lor au fost identificate, existînd informații intensive despre modul său de replicare, expresie și reglare în diferite celule ale mamiferelor.

În principiu, formarea DNA recombinant din DNA SV40 și gena de interes se realizează prin tehnicile obișnuite de legare a genei de DNA viral întreg sau de segmentele sale subgenomice avînd capete coezive induse enzimatic.

Dar, pentru a realiza un DNA recombinant biologic activ avînd proprietatea de a se replica și exprima în celula gazdă, proiectul obținerii lui trebuie să țină cont de unele particularități ale genomului virusului SV40.

În primul rînd, DNA recombinant trebuie să conțină intactă originea („*ori*") replicării DNA SV40. În al doilea rînd, pentru ca incapsidarea în virion să aibă loc este obligatoriu ca molecula de DNA să fie mai mică de 5,3 Kbp, cît reprezintă o lungime de genom matur de SV40.

În al treilea rînd, trebuie ținut seama de faptul că prin excizia unei părți din genomul SV40, DNA recombinant devine defectiv (funcțiile genetice ale părții excizate lipsesc). În consecință el poate fi propagat numai în prezența unui virus ajutător *(helper)* care să-i suplinească produsul (sau produsele) genei (genelor) îndepărtate. Astfel, dacă prin excizie se îndepărtează regiunea tîrzie a genomului, DNA recombinant construit poate fi propagat în prezența unui mutant de SV40 care are regiunea timpurie defectivă. Un astfel de mutant este cel sensibil la temperatura înaltă denumit *ts*A.

DNA recombinanți construiți pe baza principiilor menționate au avut unele neajunsuri și anume s-au replicat numai în celule permisive, ceea ce excludea posibilitatea utilizării lor ca vectori universali în multe celule animale specializate și diferențiate, posibile gazde pentru genele transduse. În plus, există și un alt inconvenient: în cursul infecției DNA recombinant determină moartea celulelor. Ca atare, astfel de DNA

recombinanţi nu pot fi utilizaţi ca vectori pentru exprimarea genelor transduse în celule care se multiplică continuu.

Deci această cale trebuia abandonată, întrucît cu ajutorul ei nu se pot transfera şi menţine gene în diferite celule. Ea nu are nici o perspectivă de a fi utilizată ca mijloc de terapie genică.

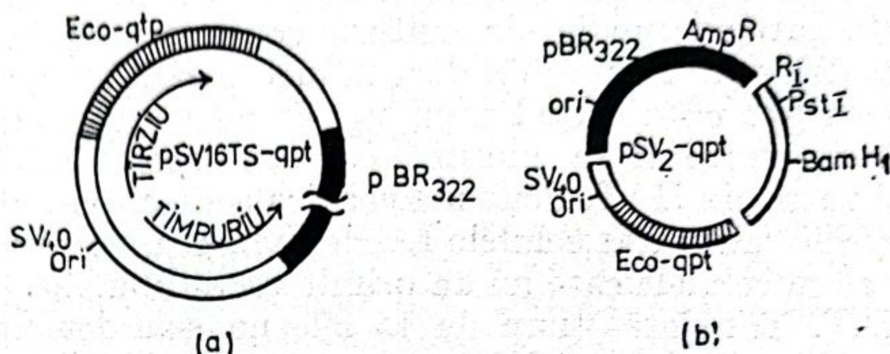


Fig. 71. Principalele caracteristici ale vectorilor *pSV1GT5-gpt* (a) şi *pSV2-gpt* (b). Zonele nehaşurate provin de la genomul virusului SV40 (modificat după *Mulligan* şi *Berg*, 1980).

În consecinţă, s-au proiectat şi realizat alţi vectori care evită în bună parte neajunsurile menţionate. Astfel de vectori, cum sînt cei din seria *pSV* (*pSV1*, *pSV2* etc.) construiţi de Mulligan şi Berg (1980) se pot integra în cromozomul celulei sau pot fi menţinuţi ca părţi componente ale unei molecule de DNA care se replică autonom (fig. 71).

Caracteristicile principale ale noilor vectori sînt următoarele:

— conţin gena Ecogpt care codifică enzima xantinguaninfosforiboziltransferaza (XGPRT) în bacteria *E. coli*. S-a ales gena *Ecogpt* pentru că ea poate fi uşor selecţionată. Enzima XGPRT diferă de enzima analoagă din celulele de mamifere şi anume hipoxantinguaninfosforiboziltransferaza (HGPRT) prin aceea că — în sinteza nucleotidelor — xantina este mult mai activă ca substrat decît hipoxantina (Miller, Ramsey şi Krenitsky, 1972). Întrucît HGPRT nu utilizează xantina ca substrat, celulele mamiferelor nu convertesc xantina la acid xantilic sau la acid guanilic. De aici rezultă că gena *Ecogpt* poate fi utilizată ca un marker selectiv;

— conţin partea esenţială din plasmida *pBR322*. În vectorul pSV_1 porţiunea de plasmidă este de 4 Kbp, iar în vectorul pSV_2 şi pSV_5 fragmentul de *pBR322* este de 2,3 Kbp. De menţionat că fragimentul de *pBR322* conţine în mod obligatoriu originea *(ori)* replicării plasmidei şi markerului ampicilinazei (amp) de selecţie care îi oferă rezistenţa la ampicilină — gena ampicilinazei (amp). Introducerea fragmentului de *pBR322* în vector îi conferă acestuia proprietatea de a se multiplica şi în celule bacteriene. Litera *p* situată înaintea denumirii vectorului precizează tocmai această proprietate;

— conţin regiuni ale genomului SV40. Cea mai importantă dintre acestea este regiunea *ori*, responsabilă de originea replicării sale. Datorită ei vectorii se replică şi exprimă în diferite celule de mamifere.

VI.5.2.1 Transformarea celulelor umane Lesch-Nyhan cu vectorul pSV$_2$-gpt.

Seegmiller, Rosenbloom şi Kelley (1967) au arătat că celulele Lesch-Nyhan sînt lipsite de enzima HGPRT. Pentru acest motiv ele nu pot creşte într-un mediu de cultură conţinînd hipoxantină (H), aminopterină (A) şi timidină (T), deci în mediu HAT. Dacă s-ar introduce însă gena *gpt* cu ajutorul unui vector adevărat ar trebui ca în situaţia în care vectorul se exprimă corect — aceste celule să poată fi cultivate şi pe mediu HAT. Pentru a verifica această posibilitate Mulligan şi Berg (1980) au tratat celulele Lesch-Nyhan cu vectorul *pSV$_2$-gpt*. Ei au observat că celulele care nu au primit vectorul nu au supravieţuit în mediu HAT. Totodată, timp de 15 zile nu s-au detectat clone. În schimb, culturile tratate cu *pSV$_2$-gpt* au generat colonii în 7—10 zile. Acestea au fost apoi recoltate şi subcultivate după 15 zile. S-au obţinut 10 pînă la 20 colonii per 10^5 celule, ceea ce a dat o frecvenţă de transformare de 10^4.

Mai mult chiar, celulele transformate de *pSV$_2$-gpt* testate pentru prezenţa enzimei bacteriene XGPRT au dat rezultate pozitive, după aproximativ 40 de diviziuni celulare. De aici s-a dedus două concluzii clare şi anume:

— gena bacteriană *gpt* introdusă cu ajutorul vectorului *pSV$_2$-gpt* s-a exprimat în celulele umane Lesch-Nyhan;

— transformanţii realizaţi cu vectorul respectiv sînt genetic stabili.

Perspective: Aşa cum s-a menţionat mai sus, exprimarea genelor procariote în celulele mamiferelor are o importanţă fundamentală pentru viitoarele încercări de corectare a unor defecte genetice. Odată ce a devenit posibil să se introducă gena *gpt* a bacteriei *E. coli* în celulele umane se poate spune că s-a deschis calea introducerii unor gene procariote diferite în celulele umane. Vectorii nou construiţi au suficiente regiuni moleculare care pot fi utilizate pentru a insera în celulele mamiferelor una sau mai multe gene de interes. De exemplu, în regiunea transcrierii tîrzii a segmentului SV40 există situsuri pentru enzimele de restricţie Eco *R*I, Pst I şi Bam *H*I unde se poate opera cu succes în scopul amintit.

Bibliografie

1. Agarwal, K.L., Buchi, H., Caruthers, M.H., Gupta N.K., Khorana, K., Kumar, A., Ohtzuka, E., Rajbhandary, U.L., Van der Sande, J.H., Sgaramella, V., Weber, H., Yamada, T., *Nature*, **227**, 27 (1970).
2. Baltimore, D., *Nature*, (London) **226**, 1209 (1970).
3. Baltimore, D., *Bacteriol. Rev.*, **35**, 235 (1971b).

4. Baltimore, D., Smaler, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **68**, 1507 (1971).
5. Bolognesi, D.P., Montelaro, R.C., Sullivan, S.J., *Med. Microbiol. Immunol.*, **164**, 97–113 (1977).
6. Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher M., Rivier, J., Guillemin, R., *Science*, **179**, 77 (1973).
7. Coffin, J.M., Temin, H.M., *J. Virol.*, **7**, 625–634 (1971).
8. Crea, R., Kraszewski, A., Hirose, T., Itakura, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **75**, 5765 (1978).
9. Dahlberg, J.E., Sawer, R.C., Taylor, J.M., Farasa, J., Levinson, W.E., Goodman, H.M., Bishop, J.M., *J. Virol*, **10**, 1126–(1974).
10. Delovich, T.L., Davis, B.K., Holme, G., Scon, A.H., *J. Mol. Biol.*, **69**, 373 (1970).
11. Diggelman, H., Faust, C.H., Mach, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **70**, 693 (1973).
12. Englund, P.T., *J.Biol. Chem.*, **246**, 5684 (1971).
13. Fiers, W. et al., *Nature*, **273**, 113 (1978).
14. Fritsch, E.F. et al., *Cell*, **19**, 959 (1980).
15. Guarente, L., Roberts, T.M., Ptashne M., *Science*, **209**, 1428 (1980).
16. Gupta, N.K., Khorana, G.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **61**, 215, (1968).
17. Gupta, N.K., Ohtzuka, E., Sgaramella, V., Buchi, V., Kumar, A., Weber, H., Khorana, G.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **60**, 1338 (1968).
18. Gupta, N.K., Ohtzuka, E., Weber, H., Chang, S.H., Khorana, G. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **60**, 285 (1968).
19. Gurgo, C., Ray, R.K., Thiung, L., Green, M., *Nature*, (London) **229**, **111** (1971).
20. Hurwitz, J., Leis, J.P., *J. Virol.*, **9**, 116 (1972).
21. Itakura, K., Hiroșe, T., Crea, R., Riggs, A.D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., Boyer, H.W., *Science*, **198**, 1056 (1977).
22. Itakura, K., Riggs, A.D., *Science*, 209, 1401 (1980).
23. Jackson, Symons, *Berg, citați de Mulligan și Berg* (1980).
24. Kacian, D.L., *Nature, New Biol.* **235**, 167 (1972).
25. Kacian, D.L., Watson, K.F., Burny, A., Spiegelman, S., *Biochim. Biophys. Acta* **246**, 365(1971).
26. Chang, C.Y., Temin, H.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **69**, 1550, (1972).
27. Khorana, G.H., *Pure Appl. Chem.*, **17**, 349 (1968).
28. Khorana, G.H., *Proc. VIIth Inter. Cong. Biochim.* Tokyo, **1967**, **17** (1968).
29. Manly, K.F., Msoler, D.F., Gromfield, E., Baltimore, D., *Virol.*, **7**, 106–111 (1971).
30. Masamune, Y., Richardson, C.C., *J. Biol. Chem.*, **246**, 2692 (1971).
31. Mc. Donnell, J.P., Garapin, A.C., Levinson W.E., Quintrell N., Fanshier, L., Bishop, J.M., *Nature*, (London) **228**, 433–435 (1970).
32. Miller, R.L., Ramsay, T.H., Krenitsky, G., Elian, B., *Biochemistry*, **11**, 4723 (1972).
33. Mizutani, S., Boettiger, D., Temin, H.M., *Nature*, **228**, 424 (1970).
34. Mizutani, S., Temin, H.M., Kodana, M., Wells R.D., *Nature, New Biol.* **230**, 232–35 (1971).
35. Mölling, K., Bolognesi, D.P., Bauer, H., Busen, N., Plassmann, H.W., Hausen, P., *Nature New Biol.*, **234**, 240 (1971).
36. Mulligan, R.C., Berg, P., *Science*, **209**, 1422 (1980).
37. Palmiter, R.D., Palacios, R., Schimke, R.T., *J. Biol. Chem.*, **247**, 3296 (1972).
38. Reich, E., *Science*, **143**, 684 (1964).
39. Ross, J., Scolnick, E.M., Torado, G.J., Aaronson S.A. *Nature New Biol.*, **231**, 163 (1971).
40. Salser, W.N., *Annu. Rev. Biochem.*, **923**, (1974).
41. Sarkar, P.K., Moscona, A.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **70**, 1667, (1973).
42. Seegmiller, J.E., Rosenbloom, F.M., Kelly, W.H., *Science*, **155**, 1682 (1967).
43. Scheller, R.H., Dickerson, R.E., Boyer, H.W., Riggs, A.D., Itakura, K., *Science*, **196**, 186 (1977).
44. Shine, J., Dalgarno, L., *Nature*, **254**, 34 (1975).
45. Steitz, J.A., in „The ribosomes", Baltimore University Press p. 479 (1974).

46. Stevens, R.H., Williamson, A.R., *J. Mol. Biol.*, **78**, 505 (1973).
47. Temin, H.M., *Virology*, **20**, 577(1963).
48. Temin, H.M., *Perspective in Biology and Medicine*, 14, 11 (1970).
49. Temin, H.M., *Annu. Rev. of Genetics*, **8**, 155 (1974).
50. Temin, H.M., Baltimore, D., *Adv. Virus Research*, **17**, 129 (1972).
51. Temin, H.M., Mizutani, S., *Nature*, **226**, 1211 (1970).
52. Ullrich, Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W.J., Goodman, H.N., *Science*, **196**, 1313 (1977).
53. Vale, W., Ling, N., River, J., Villareal J., Rivier, C., Douglas, C., Brown, M., *Metabolism*, **25**, 1491 (1976).
54. Verma, I.M., Meuth, N.F., Bromfield, E., Manly, K.F., Baltimore, D., *Nature*, (London) **233**, 131 (1971).
55. Verma, I.M., Temple, G.F., Fan, H., Baltimore, D., *Viral Replication and Cancer Proc.*, 2nd. Duron-Reynolds Int. Symp., Barcelona (1973).

VII. Proprietățile celulelor-gazdă în care se replică DNA recombinant

În momentul în care se hotărăște folosirea tehnologiei DNA recombinant, o primă problemă care apare în fața cercetătorului este alegerea sistemului de celulă gazdă pentru vehiculul modificat. Apare deci inevitabil întrebarea: ce fel de celule pot fi întrebuințate pentru exprimarea și multiplicarea DNA recombinant?

Marea majoritate a cercetărilor cu DNA recombinant se fac, conform normelor de protecție biologică naționale și internaționale, pe culturi bacteriene de *E. coli*, motiv pentru care vom prezenta în principal cîteva date despre aceste bacterii.

Totuși, în ultimul timp a apărut și sistemul genetic al *B. subtilis*, cu o a doua alternativă pentru cercetările de tehnologie DNA recombinant și pe care îl vom descrie în finalul acestui capitol.

VII.1. Escherichia coli

Biotipul de *E. coli* existent în natură conține peste o mie de tulpini, cele mai multe dintre ele fiind nepatogene și, colonizînd, în mod obișnuit, intestinul gros al animalelor cu sînge cald. *E. coli* poate fi găsită și în sol, precum și în apă, în special datorită contaminării lor cu fecale. Locul major însă unde se găsește în corp este intestinul gros, unde se stabilizează la o concentrație de 10^6—10^8 celule/g de conținut intestinal. Tractul intestinal superior, cuprinzînd stomacul și intestinul subțire, are o floră relativ rară a cărei concentrație este mai mică de 10^3 celule/g (Gorbach, 1971).

Există unele tulpini de *E. coli* care sînt enteropatogene, iar altele care produc infecții ale tractului urinar (Curtiss III, 1978). De asemenea, cercetări sistematice au stabilit că un număr relativ mic de tulpini

de *E. coli* pot invada țesuturi sănătoase, însă aceasta se petrece de obicei la indivizi slăbiți în urma unei intervenții chirurgicale, a unui transplant de organ sau a unor boli cum ar fi de exemplu cancerul.

VI.1.1. Factorii de virulență

Numeroase cercetări au arătat că virulența anumitor bacterii este determinată de structura suprafeței lor. Trebuie precizat însă că patogenitatea nu este determinată de un singur factor, cu toate că antigenele de suprafață pot condiționa la bacterii virulența, rezistența la fagocitoză și colonizarea intestinului (Orskov, 1978). La *Enterobacteriaceae* există două categorii de antigene de suprafață: unele compuse din polizaharide, iar altele din proteine. Cele compuse din polizaharide se divid în două categorii: antigene lipopolizaharidice *O* și antigene polizaharidice *K* capsulare. Lipopolizaharidele (*LPZ*) au trei regiuni: 1) una lipidică (lipida *A*); 2) un miez oligozaharidic și 3) un polizaharid *O* specific. S-a stabilit că lipida *A* este responsabilă de proprietățile toxice ale (*LPZ*) și probabil este similară în diferite *Enterobacteriaceae*. În schimb structura miezului oligozaharidic s-a găsit a fi diferită la *E. coli*. Polizaharidul *O* specific este caracteristic formelor netede de *Enterobacteriaceae*. Acest polizaharid constituie baza chimică a specificității antigenului *O*, iar diferitele antigene *O* sînt condiționate de diferitele componente zaharidice găsite în catena laterală *O* specifică. După cum vom arăta mai departe, mutațiile care afectează sinteza catenei laterale *O* specifice determină obținerea de mutanți rugoși. Întrucît mutanții rugoși sînt mai sensibili față de activitățile bactericidice și mai ușor fagocitați, ei sînt mai puțin patogeni și virulenți ca mutanții netezi.

VII.1.2. E. coli K12

Unele tulpini de *E. coli* inițial izolate din fecale sau instalații de canalizare și apoi menținute mai mulți ani în laborator și-au pierdut proprietățile de a coloniza intestinul și de a provoca îmbolnăviri. Dintre acestea cea mai cunoscută și curent folosită în diverse cercetări, inclusiv și cele de tehnologie a DNA recombinant este tulpina de *E. coli K12*. Aceasta a fost izolată în anul 1922 de la un pacient de la spitalul Stanford din S.U.A. Cu toate că ea supraviețuiește pasajului prin tractul intestinal uman sau al altor specii animale, nu s-a observat ca *E. coli K12* să colonizeze (Anderson, 1975).

Incapacitatea tulpinii *E. coli K12* de a coloniza intestinul sau de a produce boala se datorește probabil, cel puțin în parte, faptului că *E. coli K12* este o tulpină rugoasă incapabilă de a produce o lipopoli-

zaharidă (*LPZ*) normală (conținînd catene laterale repetate de antigen *O*), care se găsește în mod normal în tulpinile netede. În favoarea acestei interpretări pledează faptul că acele mutații care determină trecerea unui antigen patogen din forma netedă în rugoasă are ca rezultat scăderea sau dispariția virulenței sale. Rezultă că incapacitatea tulpinii de *E. coli K12* de a coloniza celulele poate fi atribuită carenței lor în *LPZ*, mai ales că o serie de autori au dovedit că *LPZ* din tulpinile netede au un rol important în colonizarea celulelor de animale și plante.

Pe baza unor studii genetice asupra structurii lipopolizaharidei din *E. coli K12*, Smith (1973) a arătat că fenotipul rugos al acestei tulpini se datorește genei defective *rfb.* Genele *rfb* care sînt legate de genele *his* sînt responsabile de structura catenei laterale a antigenului *O.* Ulterior s-a precizat că fenotipul neted impune necesitatea ca unitatea catenei laterale a antigenului *O* să se repete iar această proprietate este controlată de gena *rfc* (Orskov și colab., 1977).

La alte microorganisme enterice gena *rfc* este localizată fie între *gal* și *trp* fie la genele *rfh* (Orskov și colab., 1977). În plus trebuie menționat că genele *rfa* legate între *cysE* și *pryE loci* sînt responsabile de sinteza miezului de *LPZ*, iar acest miez are o structură particulară neîntîlnită la alte tulpini de *E. coli.* Pentru înțelegerea localizării diferitelor gene prezentăm unele caracteristici ale cromozomului de *E. coli K12* (fig. 72).

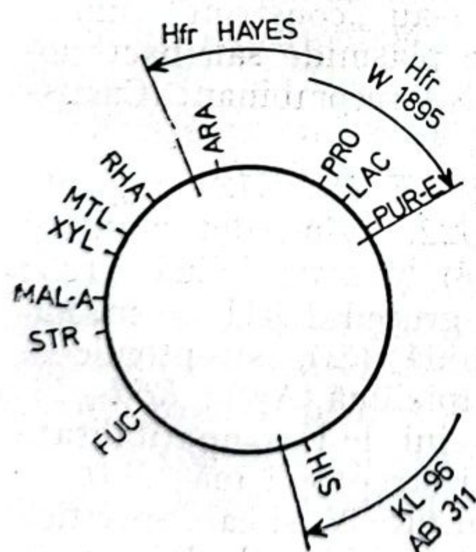


Fig. 72. Cromozomul bacteriei *E. coli K*12. Hfr este gena pentru frecvența înaltă de recombinare; ARA — gena arabinozei; PRO — gena prolinei; LAC — gena lactozei; PUR-E — gena purinei; HIS — gena histidinei; FUC — gena fucozei; STR — gena streptomicinei; MAL-A — gena maltozei; XYL — gena xilozei; MTL — gena manitolului; RHA — gena ramnozei (după *Formal* și *Hornic*, 1978).

VII.1.2.1. **Proprietățile gazdelor EK1.** Tulpinile de *E. coli K12* denumite *EK1* sau *B1*, care se utilizează curent în cercetările de tehnologie a DNA recombinant cu risc mic, conțin mutații adiționale care nu sînt prezente în tulpina parentală *K12.* Datorită acestor mutații s-a ajuns la diminuarea și mai accentuată a proprietăților lor de a colo-

niza intestinul animalelor cu sînge cald și de a supraviețui în afara condițiilor artificiale de laborator.

O primă mutație existentă în tulpinile *EK1* este mutația *thy A*, datorită căreia bacteriile cresc numai în prezența timinei sau timidinei. Bacteriile posedînd această mutație au o capacitate redusă de a supraviețui în urma trecerii lor prin intestinul uman sau al șobolanului (Smith, 1975; Curtiss III, 1978).

A doua mutație, β-*gal KTE*, determină creșterea substanțială a capacității de transformare a bacteriei de către DNA plasmidic. Totodată ca o consecință a acestei mutații bacteria trece într-o formă mai rugoasă întrucît mutația provoacă deleția galactozei din miezul *LPZ*.

A treia mutație, *rec A*, induce creșterea sensibilității bacteriilor la lumina solară, în general, și la razele ultraviolet, în special.

A patra mutație, vizează necesitatea prezenței unui sau a mai multor aminoacizi pentru creșterea bacteriilor. Prin introducerea acestei mutații s-a avut în vedere diminuarea suplimentară a capacității de creștere a bacteriilor în afara laboratorului.

VII.1.2.2. **Proprietățile gazdelor EK2.** Pentru cercetările cu potențial de risc moderat spre ridicat, normele în vigoare în diferite țări (S.U.A., U.R.S.S., Anglia etc.) privind cercetările de tehnologie a DNA recombinant, impun folosirea gazdelor de tip *EK2*. Acestea au o capacitate mai scăzută de supraviețuire în afara laboratorului decît gazdele de tip *EK1*, deoarece prezintă mutații suplimentare care „mutilează" și mai mult bacteria. În scopul atingerii exigențelor impuse de protecția biologică de tip *EK2*, în diferite laboratoare s-au „construit" tulpini de *E. coli K12* gazde speciale pentru anumite plasmide sau bacteriofagi folosiți curent ca vehicule în tehnologia DNA recombinant (Curtiss și colab., 1977).

O astfel de gazdă este χ *1776*, derivată din *E. coli K12* care poate purta următoarele plasmide: *pBR313*, *pBR322*, avînd determinanți specifici pentru rezistența la ampicilină (Ap^r) și tetraciclină (Tc^r); *R1drd19*, plasmidă *R* derepresată aparținînd grupului *F*II de incompatibilitate specifică, rezistență la sulfonamidă (S^r), streptomicină (Str^r), cloramfenicol (Cm^r), kanamicină (K^r), ampicilină (Ap^r); *R64—11*, tot o plasmidă *R* derepresată aparținînd grupului de incompatibilitate L, și care specifică rezistența la tetraciclină și streptomicină; *N31* — plasmidă *R* aparținînd grupului de incompatibilitate *N*, și care specifică rezistența la tetraciclină, streptomicină și sulfonamidă. O altă gazdă construită în special pentru multiplicarea bacteriofagului folosit ca vector este tulpina χ *1953* (DP-50).

Întrucît gazda χ *1776* este, așa cum am arătat, purtătoare a principalelor plasmide (*pBR313* și *pBR322*) folosite în experiențele de tehnologie a DNA recombinant, vom descrie cîteva dintre caracteristicile ei de bază.

Datorită existenţei a două mutaţii, χ *1776* are nevoie de prezenţa acidului diaminopimelic (DAP), un component unic al stratului rigid din peretele celulei bacteriene. În absenţa DAP, celulele de χ *1776* lizează. Efectul letal al lipsei de DAP este facilitat şi de altă mutaţie, care împiedică sinteza acidului cholanic, un polizaharid capsular. Acesta este sintetizat de celulele de *E. coli* în condiţii speciale de stress şi are rolul de a inhiba moartea celulelor cauzată de lipsa DAP.

Mutanţii *dap⁻K12* nu au capacitatea de supravieţuire în urma trecerii lor prin tractul intestinal. Cantităţile de DAP derivate din distrugerea altor bacterii în tractul intestinal sînt insuficiente pentru a preveni moartea celulelor prin lipsă de DAP. În plus, faptul că organismele eucariote nu sintetizează DAP determină ca mutanţii *dap⁻* să nu poată supravieţui în afara condiţiilor speciale de laborator.

O altă proprietate esenţială a lui χ *1776* este dependenţa creşterii sale de prezenţa timinei sau timidinei, componente indispensabile pentru sinteza DNA. În absenţa acestei baze pirimidinice se produce degradarea DNA, iar celulele mor.

Tulpina χ *1776* este de 300 ori mai sensibilă la lumina solară decît tulpinile parentale *K12*, ceea ce o face foarte vulnerabilă la expunerea la lumină. De asemenea, ea nu este dotată cu echipamentul necesar de reparare prin excizie a alterărilor produse de razele ultraviolete în molecula de DNA.

Imposibilitatea supravieţuirii tulpinii χ *1776* după trecerea ei prin tractul intestinal se datoreşte şi sensibilităţii ei faţă de bilă, fapt dovedit prin experienţele efectuate pe şobolani (Curtiss şi colab., 1977).

Existenţa unei constelaţii de şase mutaţii în χ *1776* condiţionează structura membranei exterioare, care devine sensibilă atît faţă de bilă cît şi faţă de o serie de chimicale, detergenţi şi antibiotice. Astfel, alături de defectul tulpinii *K12* în ceea ce priveşte sinteza *LPZ*, componentă esenţială din peretele celular, tulpina χ *1776* prin defectele sale adiţionale devine şi mai sensibilă în mediul înconjurător faţă de agenţii curent utilizaţi pentru dezinfecţie.

S-a constatat şi faptul că mutantul χ *1776* este mai sensibil decît tulpina parentală *K12* faţă de agenţii bactericizi existenţi în ser.

VII.1.2.3. **Proprietăţile gazdelor EK3.** Conform normelor în vigoare, gazdele de tip *EK3* sînt similare cu cele de tip *EK2*, dar spre deosebire de acestea din urmă ele sînt supuse la teste suplimentare de sensibilitate. După cunoştinţele noastre, pînă în prezent, nu s-au avizat încă sisteme bacteriene gazdă-vehicul care să îndeplinească condiţiile criteriilor *EK3*.

VII.2. Bacillus subtilis

Această bacterie este un microorganism formator de spori, răspîndit în mod natural în sol, de unde a și fost izolat. O serie de cercetători au dovedit că în general el este nepatogen. Totuși în anumite cazuri cînd gazdele au fost serios compromise, s-au pus în evidență infecții cu *B. subtilis*. Astfel, Farrer (1963) constată trei tipuri de infecții cu bacili nepatogeni: a) infecții locale la nivelul unor organe lezate cum este ochiul; b) infecții mixte în prezența unor organisme patogene și c) infecții diseminate, cauzate în principal de o traumă. La acestea se mai poate adăuga și observația lui Ihde și Armstrong (1973) care constată infecții cu *B. subtilis* în gazde compromise imunologic.

În acest context, *B. subtilis* nu poate fi considerat total nepatogen pentru om. Pentru a-i reduce în mod substanțial persistența se recomandă a se lucra cu mutanți asporogeni, care nu pot supraviețui bine în natură; mutanții asporogeni se autolizează rapid în faza lor staționară de creștere (Brown și Young 1970). Întrucît mulți dintre mutanții asporogeni mai păstrează capacitatea de transformare, ei sînt utilizați în cercetările de inginerie genetică.

Prima transformare a *B. subtilis* a fost realizată de Spizizen (1958) care a reușit „transformarea unor tulpini biochimice deficiente de *B. subtilis* de către deoxiribonucleat".

Cercetările ulterioare au stabilit condițiile de transformare heteroloagă, adică acea transformare a bacteriei provocată de un DNA extras dintr-o altă specie sau transformarea interspecifică. S-a constatat că frecvența transformării este în general scăzută și că este influențată de doi factori principali: a) analogia bazelor din zona locului de integrare a DNA heterolog și b) prezența situsurilor de restricție nemetilate (Wilson și Young, 1972). Recent, făcîndu-se un bilanț al avantajelor și dezavantajelor pe care le prezintă *B. subtilis* în cercetările de tehnologie a DNA recombinant s-a considerat că are:

a) avantaje: este nepatogen; are o frecvență ridicată de transformare (4%); are o hartă genetică circulară cu 220 loci definiți; posedă vectori bacteriofagi (*Ø3T*); conține plasmide criptice; permite incorporarea plasmidei *Col E1*; conține situsuri specifice pentru endonucleaze.

b) dezavantaje: vectorii săi potențiali nu au fost suficient de studiați pentru a li se cunoaște harta genetică; plasmidele cunoscute sînt criptice atît la *B. subtilis*, cît și în *B. pumilus*; pînă în prezent nu s-au realizat tulpini de *B. subtilis* care să fie incapabile de a supraviețui în sol (Young, Duncan și Wilson, 1977).

În continuare vom prezenta succint unele probleme privind construcția de DNA recombinanți pentru sistemul *B. subtilis*. O dificultate mare întîlnită aici este faptul că nici una din plasmidele identificate nu posedă trăsături selective (Lovett și Bramucci, 1975), de unde re-

zultă necesitatea construirii de vectori plasmidici sau virali (bacteriofagi) speciali. Un astfel de vector este bacteriofagul *Ø3T*. Acesta este un bacteriofag temperat izolat de Tucker (1969) din sol. Totodată el a arătat că infecția cu acest fag produce prototropie prin conversia lizogenetică a clonelor de *B. subtilis thy⁻*. Fagul conține gena *thy* P_3 care specifică activitatea timidilatsintetazei.

Două grupe de cercetători, Young, Duncan și Wilson (1977) și Ehrlich și colab. (1977) au incorporat gena *thy* P_3 din fagul *Ø3T* în două plasmide diferite; prima, în plasmida *pMB9*, iar a doua, în plasmida *pSC101*, obținînd plasmide liniare. În mod surprinzător noua plasmidă denumită *pCD1*, obținută din *pMB9* funcționează atît în *B. subtilis* 168, cît și în *E. coli*, ceea ce va servi fără îndoială la transferul de gene dintre aceste specii prin intermediul ei. Cercetările pentru a realiza vehicule avînd ca marker selectiv gena *thy* P_3 sînt în curs.

Bibliografie

1. Anderson, E.S., *Nature*, **255**, 502 (1975).
2. Brown, W.C., Young, F.E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 564 (1970).
3. Curtiss, R. III, *The Journal of Infectious Diseases*, **137**, 668 (1978).
4. Curtiss, R. III, Pereira, D.A., Hsu, C., Hull, S.C., Clark, J.E., Maturin, L.I., Goldschmidt, R., Moody, R., Inoue, M., Alexander, L., *Recombinant Molecules*, Raven Press, p. 45, (1977).
5. Ehrlich,. S.D., Bursztyn-Pettegrew H., Stoynowski I., Lederberg, J., *Recombinant Molecules*, Raven Press, **69** (1977).
6. Farrar, W.E., *Am. J. Med.*, **34**, 134 (1963).
7. Formal, S.B., Hornic, R.B., *J. Inf. Diseases*, **137**, 641 (1978).
8. Gorbach, S.L., *Gastroenterology*, **60**, 1110 (1971).
9. Ihde, D.C., Armstrong, D., *Am. J. Med.*, **55**, 839 (1973).
10. Lovett, P.S., Bramucci, M.G., *J. Bacteriol.*, **124**, 484 (1975).
11. Orskov, I., Orskov, F., John, B., Jann, B., *Bact. Rev.*, **41**, 667 (1977).
12. Orskov, F., J. *Inf. Diseases*, **137**, 630 (1978).
13. Smith, H.W., *J. Gen. Microbiol.*, **77**, 151 (1973).
14. Smith, H.W., *Nature*, **255**, 500 (1975).
15. Spizizen, J., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (*S.UA.*), **44**, 1072 (1958).
16. Tucker, R.G., *J. Gen. Virol.*, **4**, 484 (1969).
17. Young, F.E., Duncan, C., Wilson, G.A., *Recombinant Molecules*, Raven Press, 33, (1977).

VIII. Metode de identificare a DNA recombinant

VIII.1. Excizia segmentului de DNA introdus în DNA recombinant

DNA recombinant introdus în celulele receptoare adecvate este multiplicat odată cu multiplicarea celulelor. Prin urmare, gena introdusă artificial în vehicul este şi ea replicată odată cu vehiculul de clonare. Se creează în acest fel şi posibilitatea de a sintetiza gena respectivă *in vivo*. Dacă însă este nevoie de această genă pentru a o introduce într-un alt vehicul sau într-un alt scop, ea va trebui extrasă din vehicul. În cazul în care inserţia genei în vehicul s-a făcut cu ajutorul capetelor coezive de tip poli(dA-dT), Goff şi Berg (1978) au descris o metodă ingenioasă pentru excizia ei.

În prima etapă, DNA recombinant este scindat cu o enzimă de restricţie care acţionează numai în zona moleculei de DNA a vehiculului. Se obţine astfel o moleculă lineară conţinînd gena de interes inserată, flancată de capete de poli(dA-dT). Această moleculă bicatenară este apoi denaturată pentru a se obţine o moleculă monocatenară. Datorită existenţei secvenţelor de poli(dA) şi poli(dT) în aceste molecule, printr-o renaturare rapidă ele se circularizează intramolecular lăsînd partea de DNA a vehiculului sub forma unor „cozi" (fig. 73). S-au format în acest fel două molecule monocatenare de tip *snap back*. În continuare cozile monocatenare, constituite din molecula vehiculului, sînt digerate de o enzimă specifică — exonucleaza VII din *E. coli*, iar porţiunea moleculei cuprinsă în interiorul cercurilor rămîne protejată în urma acestui tratament. Incubarea acestei molecule circulare monocatenare de DNA la 88°C în prezenţa NaCl 1 M determină formarea moleculelor bicatenare de DNA ale genei inserate iniţial în vehicul. Ele pot fi purificate prin electroforeză în gel de agaroză şi utilizate atît pentru inserţia lor într-un nou vehicul (după un prealabil tratament cu o exonuclează adecvată), cît şi pentru alte experimente.

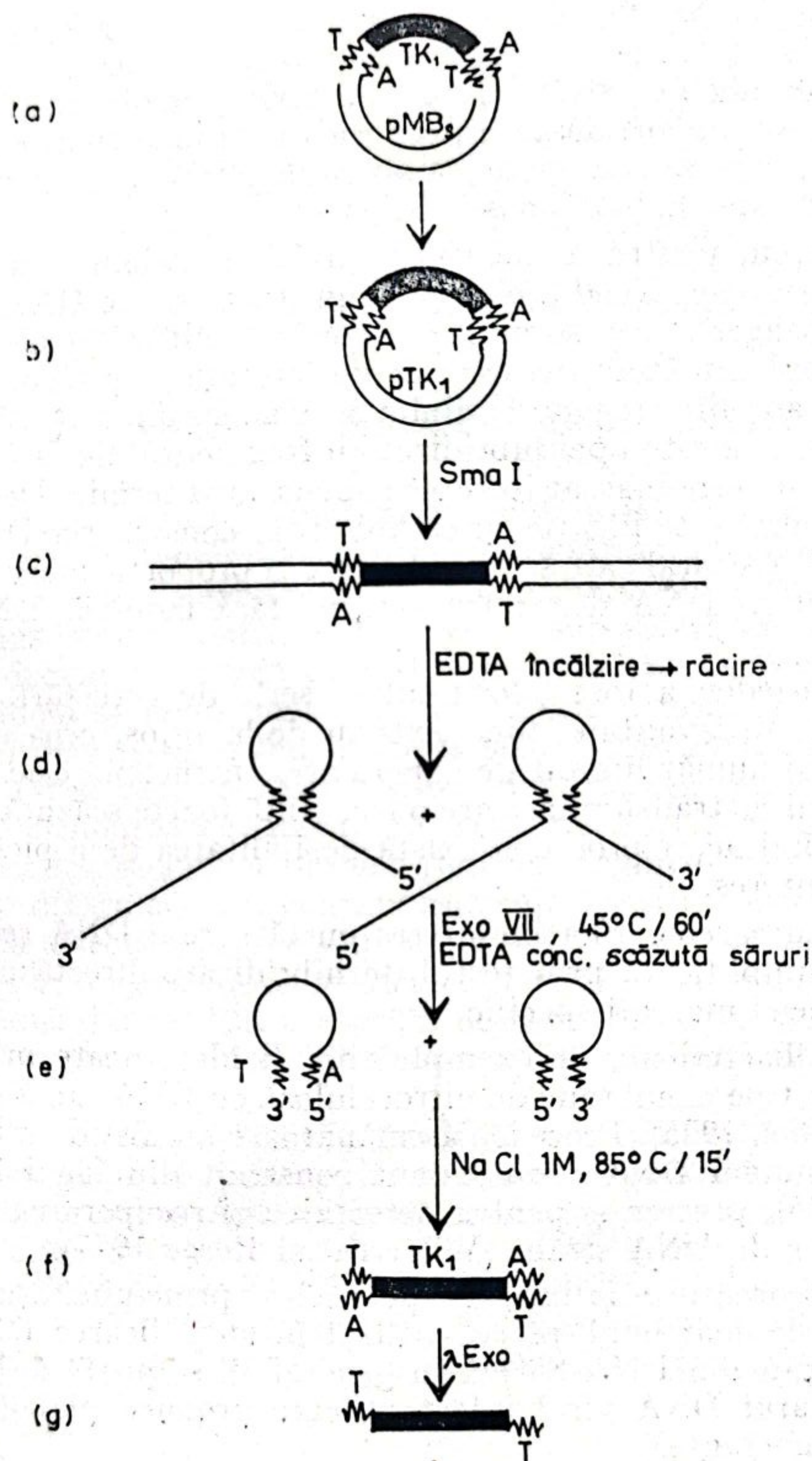


Fig. 73. Schema de excizie a genei timidinkinazei de *E. coli* (TK_1), inserată în plasmida *pMB9* (după *Goff* și *Berg*, 1978).

VIII.2. Identificarea directă a DNA recombinant prin testul de hibridizare

Cînd molecula de DNA recombinant nu posedă un fenotip distinctiv, ea poate fi identificată prin hibridizarea întregului DNA, extras din celulele în care se presupune că s-a multiplicat, cu una din componentele care au stat la baza construirii ei.

De exemplu, pentru a identifica un DNA recombinant construit din DNA din virusul SV40 (vehicul) şi un fragment de DNA din bacteriofagul λ (pasager), care se multiplică într-o cultură celulară, se procedează în felul următor: fiecare colonie formată este recoltată şi cultivată pentru amplificarea materialului celular, iar din cultură se extrage DNA viral. Acesta este apoi hibridizat cu fragmentul de DNA din bacteriofagul λ, care este marcat izotopic şi denaturat termic. De menţionat că acest fragment este identic cu cel folosit la construcţia DNA recombinant. Acel DNA viral care se hibridizează în proporţie mare (25—50%) cu fragmentul de DNA denaturat conţine fără îndoială DNA recombinant.

Acest procedeu a fost folosit într-o serie de cercetări. Procedeul are însă unele dezavantaje, fiind extrem de laborios, ceea ce permite realizarea unui număr limitat de experienţe. Întrucît în cele mai multe cazuri procesul de transformare are o frecvenţă foarte scăzută, înseamnă că întrebuinţînd acest procedeu există posibilitatea de a pierde tocmai coloniile de interes.

Selecţionarea coloniilor de interes purtătoare a DNA recombinant a fost mult simplificată prin testul de hibridizare directă a coloniilor cu acizii nucleici marcaţi specific.

Coloniile bacteriene, de exemplu, pot fi identificate prin hibridizarea lor direct pe membrane de nitroceluloză cu DNA sau RNA (Grunstein şi Hogness, 1975). Procedee asemănătoare au fost descrise ulterior pentru screeningul DNA recombinant construit din fagul λ (Kramer şi colab., 1976), precum şi pentru detectarea şi recuperarea genomului SV40 purtător de DNA străin (Villarreal şi Berg, 1977).

Cele trei procedee se bazează pe acelaşi principiu, aşa că dintre ele vom descrie doar unul, pe cel utilizat în identificarea DNA recombinant construit din DNA SV40. În general, el se poate aplica pentru clonarea oricărui DNA viral infectant care produce plaje sau „foci" în celulele infectante.

Etapele principale sînt: *a*) transferul stratului monocelular şi a plajelor sale pe un disc de nitroceluloză; *b*) tratamentul celulelor de pe nitroceluloză cu alcalii, pentru a denatura şi imobiliza celulele şi DNA viral pe membrană; *c*) hibridizarea celulelor cu un acid nucleic adecvat, puternic marcat radioactiv; *d*) autoradiografia discului de nitrocelu-

loză pentru a identifica plajele care conţin DNA omolog probei de DNA (sau RNA).

Radioautogramele se examinează la diferiţi timpi după infecţie. În locul în care există radioactivitate apar pete negre pe film, corespunzătoare plajelor în care DNA recombinant s-a multiplicat. Procedeul are şi avantajul că permite prin unele artificii recuperarea virusului conţinut în plajă.

VIII.3. **Identificarea chimică a pasagerului**

VIII.3.1. Determinarea secvenţelor bazelor sale

Dacă prezenţa pasagerului în vehicul poate fi dovedită indirect prin apariţia în sistemul biologic a proprietăţilor specifice pasagerului (prezenţa insulinei, de exemplu, în celulele bacteriene — în cazul în care s-au introdus genele pentru acest hormon sub formă de pasager într-o plasmidă adecvată), dovada directă a prezenţei pasagerului fixat covalent de vehicul se poate face doar prin excizie, urmată de analiza lui chimică. Excizia pasagerului poate fi făcută prin metoda specială descrisă de Goff şi Berg în 1978. Uneori identificarea se face mai simplu numai prin scindarea cu enzime de restricţie a DNA recombinant, urmată de analiza secvenţei bazelor fiecărui fragment rezultat pentru a stabili care dintre acestea conţine secvenţa specifică pasagerului.

Dovada directă a prezenţei pasagerului în molecula de DNA recombinant se obţine deci doar atunci cînd analiza chimică confirmă că pasagerul scos din vehicul are exact acelaşi număr de baze, iar bazele au exact aceeaşi secvenţă ca şi cele ale pasagerului înainte de a fi introdus în vehicul.

Pînă la publicarea lucrării lui Maxam şi Gilbert (1977) determinarea secvenţei bazelor din DNA se rezuma practic numai la analiza capetelor moleculelor. Autorii menţionaţi au propus o metodă nouă de determinare a secvenţelor bazelor DNA, care, în timpul scurt scurs de la apariţia ei şi-a făcut din plin dovada calităţilor sale: ea a fost utilizată cu succes de toate grupele de cercetători care au construit molecule de DNA recombinant pentru a proba identitate pasagerului grefat la vehicul.

VIII.3.1.1. **Principiul metodei.** Un DNA marcat cu ^{32}P la capătul 5′ sau 3′ fragmentat specific cu agenţi chimici în dreptul adeninei, guaninei, citozinei sau timinei, prin scindarea parţială în dreptul fiecărei baze determină obţinerea unui set de fragmente, a căror mărime se extinde de la capătul marcat al moleculei pînă la baza respectivă, ceea ce permite stabilirea exactă a secvenţei bazelor.

Considerînd un fragment de DNA care conţine 14 baze aşezate în ordinea:


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

^{32}P—G—G—C—A—C—G—G—A—C—A— G— G—T—T (*A*)

dacă scindarea lui parţială se face în dreptul guaninei el va da naştere la următorii şase produşi care conţin capătul marcat:

(1) ^{32}P—G
(2) ^{32}P—G—G
(3) ^{32}P—G—G—C—A—C—G
(4) ^{32}P—G—G—C—A—C—G—G
(5) ^{32}P—G—G—C—A—C—G—G—A—C—A—G
(6) ^{32}P—G—G—C—A—C—G—G—A—C—A—G—G

Aceste fragmente supuse analizei electroforetice în gel de poliacrilamidă vor migra în ordinea punctului de scindare. Adică, primul (1) spot (bandă) radioactiv va prezenta ^{32}P—G, care, fiind cel mai mic produs va avea mobilitatea electroforetică cea mai mare şi ca atare se va găsi la capătul de jos al gelului. Al doilea spot (de jos în sus) va conţine ^{32}P—G—G şi va avea o mobilitate electroforetică mai mică, al treilea va conţine ^{32}P—G—G—C—A—C—G, şi aşa mai departe, ultimul fiind deci ^{32}P—G—G—C—A—C—G—G—A—C—A—G—G, care are mobilitatea cea mai mică. Acelaşi fragment de DNA, dacă este scindat parţial în dreptul adeninei, va da naştere la următorii produşi marcaţi:

(1′) ^{32}P—G—G—C—A
(2′) ^{32}P—G—G—C—A—C—G—G—A
(3′) ^{32}P—G—G—C—A—C—G—G—A—C—A

Aceştia, analizaţi electroforetic, vor avea mobilitatea în concordanţă cu mărimea lor; produsul (1′) va migra mai puţin decît produsul (2) obţinut prin scindarea la guanină, iar produsul (2′) mai puţin decît fragmentul (5) de la scindarea la guanină ş.a.m.d. Prin urmare, atunci cînd scindarea se face în dreptul lui G şi A benzile pe autoradiografie vor fi repartizate de jos în sus în ordinea: (1), (2), (1′), (3), (4), (2′), (3′), (5), (6).

În concluzie, conform acestui principiu, autoradiografia unui gel pe care s-a supus migrării electroforetice DNA scindat chimic în dreptul fiecărei baze permite citirea directă a secvenţei bazelor.

Metoda este limitată doar de puterea de separare a gelului de poliacrilamidă. Condiţiile experimentale puse la punct de autori permit a se determina secvenţa a aproximativ 100 de baze de la capătul marcat al DNA. Cum pasagerii utilizaţi în tehnologia DNA recombinant au în general dimensiunea mai mare decît 100 de baze, pentru analiza sec-

venței lor totale în baze se apelează la enzimele de restricție care îi scindează în fragmente ce pot fi apoi analizate.

Autorii recomandă două strategii diferite pentru analiza secvențelor de baze:

a) DNA bicatenar se fragmentează întîi cu o enzimă de restricție în două porțiuni. Acestea sînt apoi separate pe gel de poliacrilamidă, izolate din gel și, în final, analizate pentru a li se determina secvența;

b) DNA bicatenar se denaturează întîi, apoi se separă cele două catene pe gel, iar fiecare catenă este izolată și analizată în parte.

A doua variantă este preferată pentru că analiza directă (fără denaturare) a DNA bicatenar întîmpină unele dificultăți. De exemplu, reacția de metilare în secvența GGA este inhibată la G-ul din mijloc, iar în secvența AAA reactivitatea lui A este exaltată. Aceste efecte nu sînt prezente cu DNA monocatenar.

VIII.3.1.2. **Scindarea specifică a DNA.**

a) *Scindarea la guanină și adenină (G > A).* Reacția se bazează pe metilarea în prima etapă a guaninei și a adeninei, urmată de scindarea — în faza a doua — a lanțului polinucleotidic în dreptul bazelor metilate. Agentul de metilare este dimetilsulfatul. Acesta metilează guanina în poziția N_7 și adenina în poziția N_3. Datorită metilării, legătura glicozidică a bazei metilate devine instabilă și se rupe ușor prin încălzire la *p*H neutru. În acest fel deoxiriboza rămîne liberă, iar tratamentul cu alcalii (0,1 M) la 90°C determină ruperea ei de gruparea fosforică învecinată. Fragmentele rezultate în urma acestui tratament efectuat asupra unui DNA marcat la capăt cu ^{32}P, supuse electroforezei în gel de poliacrilamidă, vor da naștere la o autoradiografie pe care se vor înregistra benzi intense și slabe. Benzile intense derivă de la ruperea catenei în dreptul guaninei (deoarece metilarea guaninei se face de 5 ori mai rapid decît a adeninei), iar benzile slabe de la ruperea catenei în dreptul adeninei, motiv pentru care reacția este notată prescurtat prin G > A.

b) *Scindarea preferențială la adenină (A > G).* S-a constatat că legătura glicozidică a adenozinei metilate este mai slabă decît aceea a guanozinei metilate. Pentru ruperea ei specifică este nevoie de condiții mai blînde de hidroliză. Ca atare, tratamentul mai blînd cu acizi diluați va elibera adenina, iar hidroliza ulterioară cu alcalii va conduce la ruperea preferențială a legăturii dintre deoxiriboză și gruparea fosforică învecinată. În acest caz, benzile intense de pe autografie vor fi cele ale adeninei, iar cele slabe ale guaninei.

c) *Scindarea la citozină și timină (C + T).* Specificitatea acestei scindări se realizează prin tratarea DNA cu hidrazină. Aceasta reacționează cu citozina și timina și, clivînd baza, formează ribozilureea. Hidrazina poate reacționa apoi mai departe, pentru a produce hidrazonă. După o hidrazinoliză parțială la 20°C (hidrazină apoasă 15—18 M)

a DNA acesta este scindat cu piperidină (0,5 M). Această amină ciclică secundară catalizează β-eliminarea fosfatului, înlocuind toţi produşii reacţiei cu hidrazină. Analiza electroforetică a DNA tratat cu hidrazină arată benzi cu intensitate similară, care provin de la scindarea la citozină şi timină.

d) *Scindarea la citozină (C)*. Reacţia hidrazinei cu timina este supresată de prezenţa NaCl 2M. Tratamentul cu piperidină a DNA astfel tratat produce ruperea lui numai în dreptul citozinei. Deci benzile care se găsesc pe autoradiografie la analiza DNA tratat în condiţiile anterioare aparţin citozinei. Acestea, comparate cu cele provocate de scindarea în dreptul citozinei şi timinei (C + T), dau prin diferenţă benzile specifice pentru timină (T).

VIII.3.1.3. **Determinarea secvenţei bazelor într-un fragment de DNA.** Pentru a descrie principalele etape ale determinării secvenţelor bazelor dintr-un DNA vom lua ca exemplu tocmai pe cel dat de Maxam şi Gilbert (1977), care se referă la un fragment de DNA alcătuit din 64 de perechi de baze. Acesta a fost obţinut din operonul *lac*, cu ajutorul enzimei de restricţie Alu I izolată din *Arthrobacter luteus*, care scindează DNA la secvenţa AGCT între G şi C.

Etapele principale pentru determinarea secvenţei bazelor sînt următoarele:

a) *defosforilarea capetelor 5'*. Pentru a marca cu ^{32}P capetele 5' (sau 3') ale catenelor de DNA ele trebuie în primul rînd defosforilate. Gruparea fosforică terminală se îndepărtează prin incubarea DNA cu fosfatază alcalină;

b) *fosforilarea capetelor 5'*. Fosforilarea capetelor 5' include mai întîi o denaturare termică a DNA în prezenţa spermidinei, ceea ce creşte de cinci ori randamentul fosforilării, iar apoi incubarea produsului denaturat cu (γ-^{32}P)ATP şi polinucleotidkinază, pentru fosforilarea propriu-zisă;

c) *separarea catenelor*. DNA 5'-fosforilat cu ^{32}P este tratat cu NaOH 0,3 M pentru a-i rupe legăturile de hidrogen, iar apoi este supus electroforezei în gel de poliacrilamidă 8%. Autoradiografia produsului astfel separat arată două benzi: una rapidă şi una lentă (fig. 74), care corespund celor două catene de DNA;

d) *extracţia catenelor din gel*. Suprapunerea autoradiografiei peste gel permite localizarea benzilor care conţin cele două catene. Regiunea corespunzătoare fiecărei benzi este marcată şi apoi excizată din gel. Gelul este omogenizat şi transformat într-o pastă, care se tratează cu o soluţie de eluţie compusă din: acetat de amoniu (0,5 M), acetat de magneziu (0,01 M), dodecil sulfat (0,1%) şi etilendiaminotetraacetat (0,1 mM). Amestecul se incubează 10 ore la 37°C şi apoi se centrifughează pentru depunerea gelului. Supernatantul conţinînd catena eluată se tratează cu alcool pentru a precipita DNA monocatenar;

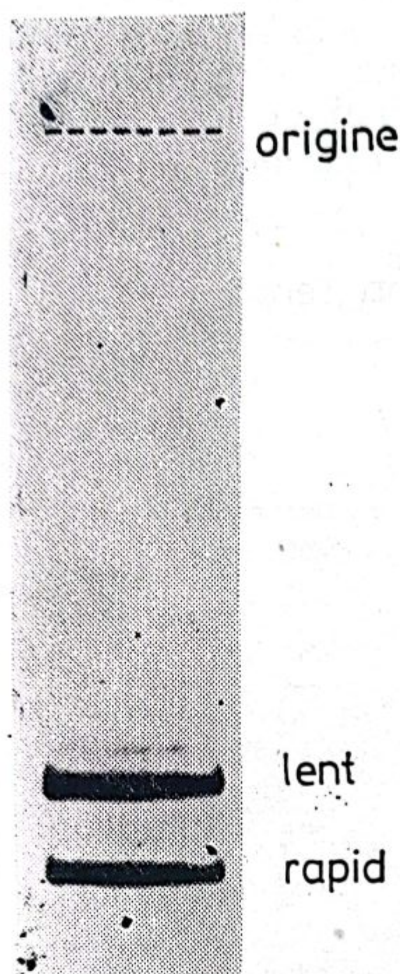


Fig. 74. Separarea electroforetică a catenelor DNA (după *Maxam* și *Gilbert*, 1977).

e) scindarea specifică a catenelor. DNA monocatenar marcat la capătul 5′ cu ^{32}P izolat din gel este împărțit în patru părți, pentru a se realiza cele patru reacții specifice descrise mai sus (G > A, A > G, C și C + T);

f) electroforeza DNA scindat specific. După scindare, fragmentele obținute sînt supuse electroforezei în gel de poliacrilamidă 20% conținînd uree 7 M. Se ia o porțiune din cele patru amestecuri corespunzătoare scindării G > A, A > G, C și C + T, se așează în patru șanțuri diferite și se pornește electroforeza cu 600—1000 V. După 12 ore de la pornirea electroforezei se pune o a doua porțiune din fiecare amestec, în aceleași șanțuri în care s-a pus prima porțiune și se continuă electroforeza. În final, gelul conține două regiuni distincte: una, de sus, corespunzătoare migrării scurte a fragmentelor și una, de jos, care corespunde migrării timp îndelungat a fragmentelor.

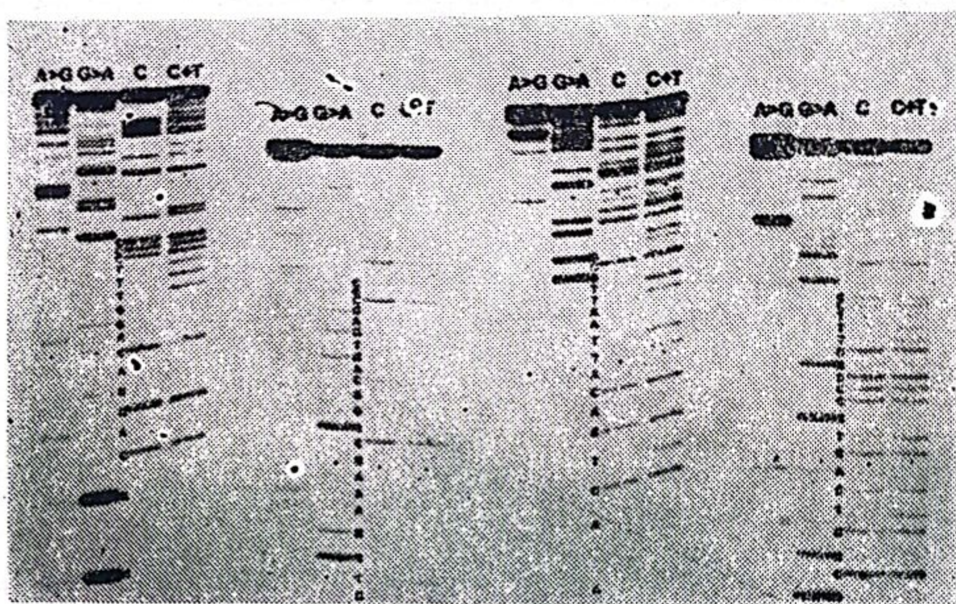
Partea de sus conține informațiile pentru partea moleculei apropiată de capătul 5′-marcat, deoarece migrarea scurtă permite separarea numai a fragmentelor mici, iar partea de jos conține informațiile pentru partea mai îndepărtată de capătul 5′ al moleculei;

g) citirea secvenței din rezultatele electroforezei. În fig. 75 (partea din stînga a fotografiei) sînt prezentate autoradiografiile celor două

regiuni ale aceluiași gel pe care s-a făcut analiza secvenței unei catene. Autoradiografia din stînga, corespunde migrării timp scurt, și arată separarea primei părți a catenei, iar cea din dreapta, care redă rezultatul migrării timp lung, prezintă fragmentele părții a doua a catenei.

În partea dreaptă a figurii sînt prezentate cele două autoradiografii obținute pentru catena a doua de DNA.

catena rapidă catena lentă



(a) (b)

Fig. 75. Principiul metodei de determinare a secvenței bazelor din DNA: a) autoradiografia secvențelor de baze din prima catenă de DNA; b) autoradiografia secvențelor de baze din catena a doua de DNA. Detalii în text (după *Maxam* și *Gilbert*, 1977).

Secvența bazelor se citește ușor din distribuția benzilor de jos în sus astfel: prima bandă de jos este în coloana notată G > A și înseamnă că ea corespunde primei baze situate la capătul 5'-marcat al catenei. A doua bandă se găsește tot în coloana G > A, ceea ce înseamnă că ea derivă de la ruperea moleculei tot în dreptul guaninei și este deci spotul dat de $^{32}P-G-G$. A treia bandă este atît în coloana C, cît și în coloana C + T, ceea ce înseamnă că ea derivă de la C aflat în poziția a treia de la capătul 5' al catenei. A patra bandă intensă se găsește în coloana întîi (A > G). Ea este însă dublată de o bandă slabă situată la același nivel în coloana G > A. Cu această ocazie trebuie precizat că o bandă intensă în prima coloană (A > G) și o bandă slabă în a doua

(G > A) înseamnă un A, iar o bandă intensă în coloana a doua cu una slabă în prima, înseamnă un G.

Prin urmare, în poziția a patra a secvenței este A, în a cincea C ș.a.m.d. Citirea continuă în sus pînă cînd benzile pot fi citite clar. Cînd ele nu se disting clar, se abandonează citirea acestei părți și se continuă pe a doua autoradiografie, pornind tot de jos în sus.

Citirea secvenței bazelor din catena a doua se face în același fel, dar din cele două autoradiografii prezentate în partea din dreapta a fig. 75. Rezultatele prezentate în fig. 75 permit stabilirea secvenței a 62 de baze în fiecare catenă. Celelalte două baze au fost citite dintr-un alt experiment.

Secvența totală a fragmentului de DNA luat ca exemplu, conținînd 64 perechi de baze, obținută prin metoda lui Maxam și Gilbert (1977) este deci următoarea:

```
pXXGGCACCACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCG
 GACCGTGGTGTCCAAAGGGCTGACCTTTCGCCCGTCACTCGC
          10          20          30         40

CAACGCAATTAATGTGAGTTAG
GTTGCGTTAATTACACTCAAXXp
     50         60
```

Bibliografie

1. Goff S.P., Berg P., *Proc. Natl. Acad. Sci. (S.U.A.)*, **75**, 1763 (1978).
2. Grunstein M.G., Hogness P.S., *Proc. Natl. Acad. Sci (S.U.A.)*, **72**, 3961 (1975).
3. Kramer R.A., Cameron J.R., Davis, R.W., *Cell*, **8**, 227 (1976).
4. Maxam A.M., Gilbert W., *Proc. Natl. Acad. Sci. (S.U.A.)*, **74**, 560 (1977).
5. Villarreal L.P., Berg P., *Science*, **196**, 183 (1977).

IX. Realizări

Aşa cum s-a arătat, tehnologia DNA recombinant a inaugurat era intervenţiei umane asupra patrimoniului ereditar al organismelor. Sîntem deci în posesia unei tehnologii pe care societatea noastră a început să o folosească pentru progresul ei ştiinţific, economic şi social. Realizările şi perspectivele tehnologiei DNA recombinant pot fi grupate în două categorii principale: una de ordin fundamental şi a doua de ordin practic.

Cele de ordin fundamental permit printre altele:

— cunoaşterea modului de organizare a genelor în cromozomi;

— stabilirea hărţii genetice a unor organisme;

— studiul fizic şi chimic al unor gene;

— studiul mecanismului de exprimare şi reglare a unor gene;

— stabilirea zonei moleculare a unor DNA virali responsabili de inducerea unor tumori.

Cele de ordin practic constau în:

— obţinerea de organisme microbiene noi, capabile de a sintetiza un produs medical sau alimentar de mare interes, prin inserţia în genomul microorganismului a genelor specifice;

— posibilitatea obţinerii de plante alimentare ameliorate, conţinînd proteine cu structură apropiată de cea a proteinelor animale;

— posibilitatea obţinerii de rase noi de animale;

— posibilitatea transformării celulelor somatice, pentru a corecta defecte genetice cum sînt anemia, fenilcetonuria, diabetul etc.;

— obţinerea de plante care cresc în simbioză cu microorganisme fixatoare de azot, eliminîndu-se pe această cale nevoia de îngrăşăminte azotoase.

În contextul arătat, domeniile beneficiare sînt numeroase, dintre care medicina, biologia, agricultura, zootehnia sînt poate cele mai ilustrative. Totodată, cu totul peste aşteptări, tehnologia DNA recombinant a condus la dezvoltarea unei noi industrii, industria biologică, ce permite mari speranţe, inclusiv în realizarea economiilor şi a descoperirii de surse noi energetice.

IX.1. Construirea DNA recombinant conținînd gena somatostatinei

IX.1.1. Planul general al construirii DNA recombinant

Anterior s-a descris sinteza chimică a genei somatostatinei ; în acest capitol vom prezenta construcția unui DNA recombinant conținînd gena respectivă ca pasager, precum și modul în care ea s-a exprimat într-un sistem biologic, pentru a controla sinteza unei polipeptide funcționale. Este de fapt vorba de prima sinteză a unui hormon polipeptidic realizată de către o genă produsă în eprubetă, performanță care aparține grupului lui Itakura (v. Itakura și colab., 1977).

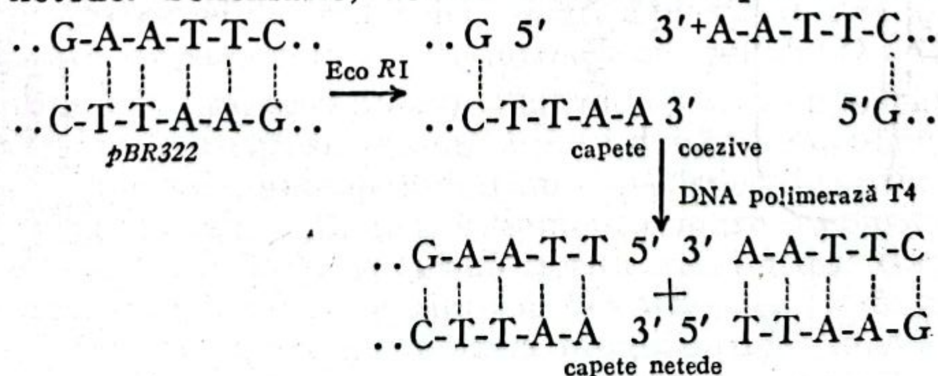
DNA recombinant a fost construit din plasmida *pBR322*, ca vehicul avînd masa moleculară de **2,6 × 10⁶** daltoni (Bolivar și colab., 1977), gena somatostatinei ca pasager, și operonul *lac*. Introducerea operonului *lac* s-a făcut în scopul trecerii expresiei informației genetice a genei sintetice a somatostatinei sub controlul elementelor operonului *lac*. S-a ales operonul *lac* și nu un alt operon, deoarece atît structura lui, cît și modul lui de acțiune sînt bine cunoscute (Gilbert și colab., 1975).

Schema generală de construire a DNA recombinant este prezentată în fig. 76.

După cum se va vedea însă mai departe, sinteza acestui DNA recombinant, care este de fapt o plasmidă himerică, este destul de complicată, iar schema din figură redă doar o imagine globală a planului de lucru. Înțelegerea modului de lucru nu poate fi însă realizată fără o descriere detaliată a numeroaselor etape parcurse. De aceea vom reda chiar fiecare artificiu experimental introdus, pentru a cunoaște modul în care s-a obținut primul DNA recombinant conținînd o genă de origine chimică care, așa cum am arătat, a reușit să controleze sinteza unui hormon.

IX.1.1.1. **Etapele construirii DNA recombinant.**

a) *Construirea plasmidei pBH10*. Digestia plasmidei *pBR322* cu enzima de restricție Eco *R*I determină deschiderea moleculei sale circulare de tip *CCI* și conversia ei într-o conformație moleculară liniară. Cele două capete monocatenare coezive, generate de Eco *R*I, sînt apoi reparate de către DNA polimeraza T4, astfel ca ele să devină bicatenare și netede. Schematic, aceste tratamente pot fi redate astfel:



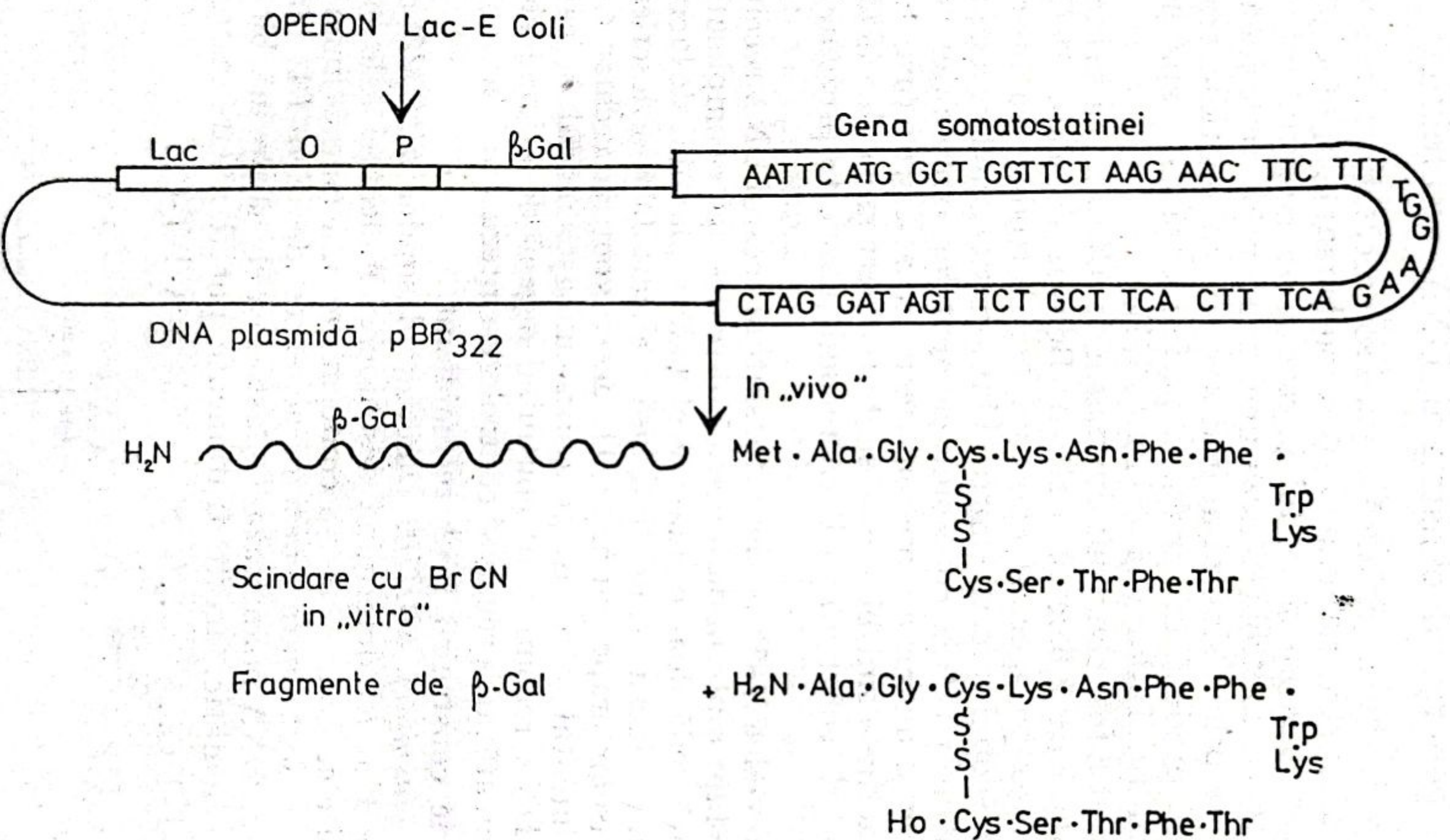


Fig. 76. Construcţia plasmidei conţinînd gena somatostatinei sintetizată chimic. Gena somatostatinei a fost sudată de elementele operonului *lac* şi introdusă în plasmida *pBR322*. Plasmida himeră astfel obţinută, denumită *pSOM*II-3 induce în celulele de *E. coli* sinteza unei proteine himere care, clivată *in vitro* cu BrCN (la nivelul metioninei), eliberează hormonul peptidic activ — somatostatina (după *Itakura* şi colab., 1977).

În continuare, capetele netede sînt legate de fragmentul Hae III cu ajutorul DNA-ligazei din *T4*. Datorită acestei inserții, cele două capete netede, care datorită DNA polimerazei au devenit de fapt două situsuri de recunoaștere pentru Eco *R*I, ajung să fie distanțate între ele de regiunea fragmentului Hae III. Aceste modificări aduse plasmidei *pBR322* afectează deci atît structura ei (devenind mai mare $2{,}74 \times 10^6$ daltoni), cît și funcția ei biologică (fiind înzestrată cu funcțiile elementelor operonului *lac*). Noua plasmidă rezultată a fost denumită *pBH10*.

Etapele construcției plasmidei *pBH10* sînt prezentate schematic în fig. 77. Cu plasmida *pBH10* astfel construită s-a indus apoi transformarea bacteriei *E. coli*, tulpina RR_1 (Bolivar și colab., 1977). Transformanții rezultați au fost apoi selecționați pentru markerii Tc^r și Ap^r, pe un mediu minimal descris de Miller (1972). Selecționarea coloniilor este facilitată de faptul că plasmida *pBH10* conține gena β-galactozidazei; coloniile sale devin colorate în albastru datorită sintezei β-galactozidazei.

Într-adevăr, screeningul a 45 de colonii izolate a condus la găsirea a trei colonii care conțineau plasmida *pBH10*, avînd două situsuri pentru Eco *R*I, separate de o regiune cu aproximativ 200 de perechi de baze. Or, fragmentul Hae III inserat în plasmida *pBR322* are tocmai 203 perechi de baze!

Mai mult chiar, analizele au arătat că inserția fragmentului s-a realizat în ordinea dorită, adică transcrierea operonului *lac* se petrece în gena Tc^r a plasmidei.

b) *Construirea plasmidei pBH20*. Din plasmida *pBH10* s-a construit apoi o nouă plasmidă denumită *pBH20*. Diferența principală între cele două plasmide constă în faptul că plasmida *pBH20* conține numai un singur situs pentru Eco *R*I, al doilea fiind eliminat. În acest scop plasmida *pBH10* s-a hidrolizat parțial cu Eco *R*I, astfel că numai unul din situsurile sale să fie atacat de enzimă. Totodată, protecția situsului al doilea pe care acționează Eco *R*I și care se găsește lîngă gena Tc^r este asigurată și de tratamentul plasmidei cu DNA-polimerază.

În aceste condiții molecula se deschide numai la situsul pentru Eco *R*I de lîngă gena Ap^r. Capetele monocatenare coezive rezultate au fost apoi eliminate prin incubarea plasmidei cu exonuclează S_1 care are proprietatea de a acționa numai asupra DNA monocatenar. În urma activității exonucleazei S_1 capetele moleculei liniare a plasmidei devin netede; în faza următoare, acestea sînt sudate între ele cu ajutorul DNA-ligazei *T4*.

c) *Construcția plasmidei pSomI*. Plasmida *pBH20* a fost întîi tratată cu Eco *R*I și Bam I. În acest fel s-au obținut două fragmente moleculare: unul mare și unul mic, ambele avînd un capăt specific enzimei Eco *R*I și celălalt specific enzimei Bam I. Fragmentul mare s-a purificat și reținut, iar cel mic s-a îndepărtat. După purificare el a fost tratat cu fosfatază alcalină și apoi sudat cu ajutorul DNA-ligazei *T4* de gena somatostatinei sintetizată chimic. În urma modificărilor aduse plasmidei

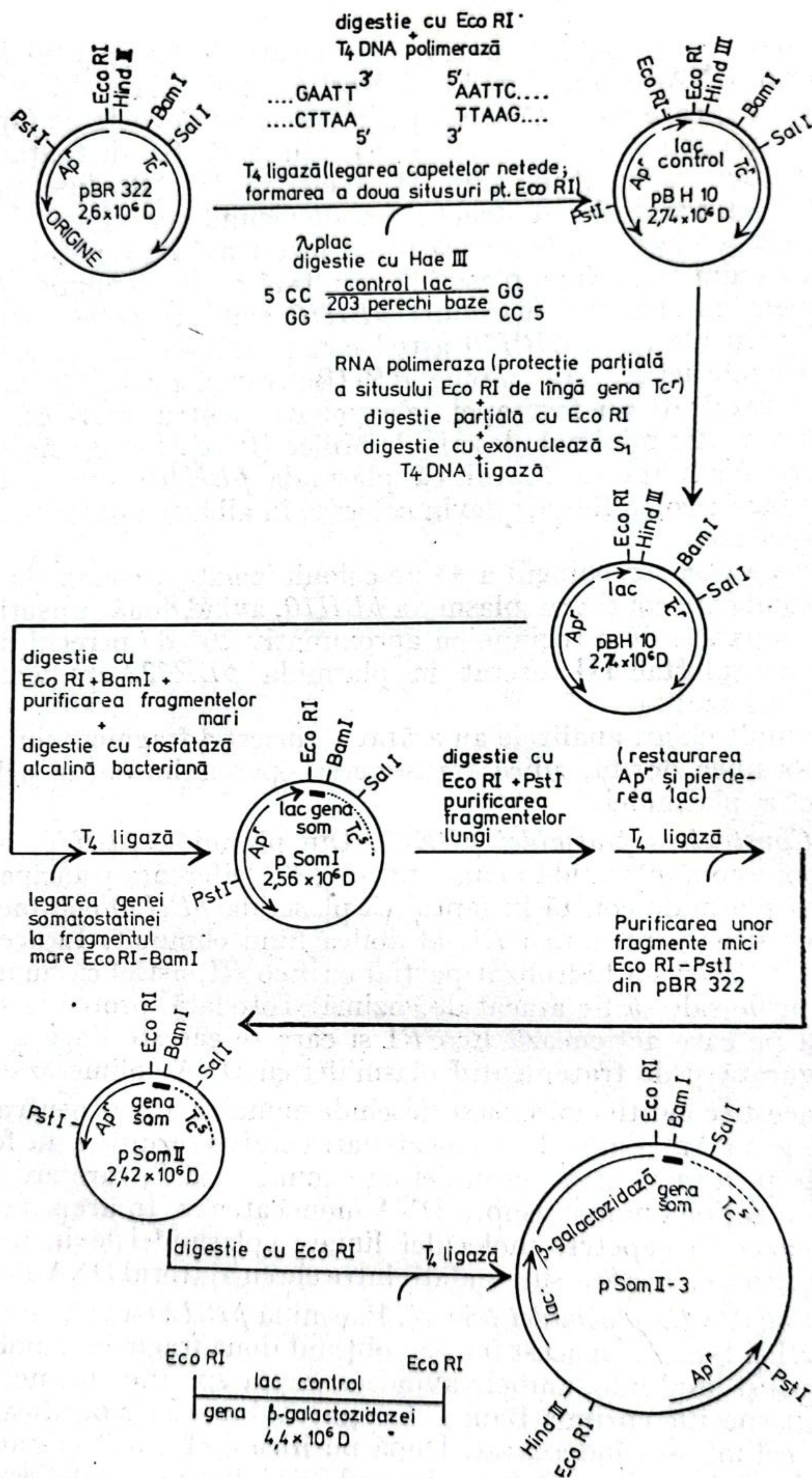


Fig. 77. Schema generală de construire a DNA recombinant conținînd gena somatostatinei (după *Itakura* și colab., 1977).

pBH20 a rezultat plasmida *pSom*I. Paralel cu acest tratament s-a efectuat și unul de control, în care fragmentul mare al plasmidei *pBH20*, obținut în urma acțiunii celor trei enzime (Eco *R*I, Bam I și fosfatază alcalină), a fost legat și circularizat în absența genei somatostatinei.

Ambele plasmide au fost apoi folosite pentru a transforma bacteria *E. coli* RR_1, iar transformanții au fost selecționați pe mediu cu indicator *X-gal*. S-au izolat 10 transformanți care prezentau sensibilitate la tetraciclină (Tc^s), iar aceștia au provenit de la plasmida *pSom*I, proba de control negenerînd nici un transformant. Mai mult chiar, analiza secvenței bazelor fragmentului mic generat de Eco *R*I și Bam I a corespuns întocmai cu secvența genei somatostatinei. În acest fel s-a dovedit că gena somatostatinei a fost într-adevăr inserată în locul dorit din plasmidă. Cu toate acestea, în cultura celulară posedînd plasmida *pSom*I nu s-a putut pune în evidență somatostatină activă.

d) *Construirea plasmidei pSom*II. Insuccesul exprimării genei somatostatinei inserată în plasmida pSomI a fost atribuit proastei localizări a genei în plasmidă. Pentru a verifica această ipoteză, dar mai ales pentru a obține exprimarea genei, s-a construit o plasmidă nouă în care gena somatostatinei a fost așezată la capătul terminal —COOH al genei β-galactozidazei. În acest scop, plasmida *pSom*I s-a hidrolizat cu Eco-*R*I și Pst I. Fragmentele astfel obținute, denumite fragmente Eco-*R*I—Pst I, au fost separate pe gel de poliacrilamidă 5%, obținîndu-se un fragment mare care poartă gena somatostatinei și un fragment mic conținînd elementele operonului *lac*. Aceleași tratamente au fost aplicate și plasmidei originale *pBR322*. Fragmentul Pst I-Eco *R*I obținut de la plasmida *pBR322* a fost apoi cuplat cu fragmentul Pst I-Eco *R*I de la plasmida *pSom*I. Plasmida rezultată, denumită *pSom*II, a fost folosită pentru a transforma celulele de *E. coli* RR_1. Transformanții obținuți au fost selecționați pentru Ap^r pe un mediu X-gal. S-a constatat că 45% din transformanți au dat naștere la colonii albe pe plăci indicatoare *X-gal*, ceea ce a dovedit că plasmidele n-au conținut operonul *lac*.

e) *Construirea plasmidei pSomII-3*. Plasmida *pSom* II și DNA λ *plac* au fost hidrolizați cu Eco *R*I, iar fragmentele obținute au fost legate între ele cu DNA-ligază *T4*. Trebuie precizat că tratamentul DNA λ *plac* cu Eco *R*I generează un fragment de $4,4 \times 10^6$ daltoni care conține controlul genei *lac* și gena β-galactozidazei. Inserția unui astfel de fragment în plasmida *pSom* II a determinat formarea unei plasmide relativ mari, de $6,8 \times 10^6$ daltoni denumită *pSom* II-3. Aceasta a fost apoi folosită pentru a transforma celulele de *E. coli* RR_1, iar transformanții au fost selecționați pentru Ap^r (pe plăci *X-gal*, conținînd ampicilină). Selecția lor s-a făcut și pe baza producerii de β-galactozidază, întrucît coloniile posedînd plasmida cu gena β-galactozidazei devin, așa cum s-a arătat, albastre. Or, aproximativ 2% dintre clone

au fost albastre. Analiza DNA din plasmidele izolate din aceste clone a dovedit că plasmidele respective sînt purtătoare ale unui fragment de DNA de aproximativ $4,4 \times 10^6$ daltoni care posedă locurile controlului operonului *lac* și cea mai mare parte din gena β-galactozidazei.

IX.1.2. Identificarea somatostatinei în celulele bacteriene

Succesul deosebit al construcției DNA recombinant conținînd gena somatostatinei a constat mai ales în faptul că gena aceasta, sintetizată chimic, a reușit să se exprime într-o celulă bacteriană care nu are în mod normal informația genetică necesară pentru a o produce. Într-adevăr, analizele au arătat că în noua variantă obținută din tulpinile conținînd plasmidele *pSom*II-*3* se poate detecta prezența somatostatinei sintetizate. Testul cel mai sensibil este cel radioimunologic denumit pe scurt RIA (de la Radio-Immuno-Assay). Astfel, după tratamentul sedimentului celular cu acid formic 70% conținînd BrCN (5 mg/ml) și după eliminarea acidului formic din BrCN sub vacuum se poate pune în evidență existența somatostatinei în sediment. Testul RIA pune în evidență mai puțin de 10 pg de somatostatină în prezența a aproximativ 16 μg de proteină bacteriană tratată cu BrCN.

Este de subliniat că tulpinile pozitive *pSom*II-*3* sau negative (*pSom*II-*2*) pentru somatostatină sînt instabile și ca atare cresc greu. Se presupune că acest dezavantaj este generat de superproducția galactozidazei incomplete și inactive. Totuși calculele au estimat că randamentul de producere a somatostatinei se poate ridica în unele cazuri chiar la 3% din cantitatea totală de proteine celulare. În majoritatea cazurilor însă randamentul este cuprins numai între 0,001 și 0,03%.

IX.2. Construirea DNA recombinant conținînd gena insulinei

În anul 1977, Ullrich și colab., iar un an mai tîrziu, Crea și colab. au construit DNA recombinanți conținînd gena insulinei. Primul grup a sintetizat gena insulinei de șobolan enzimatic, cu ajutorul reverstranscriptazei și au introdus-o în plasmida *pMB9* ca vehicul, iar al doilea grup a sintetizat chimic genele corespunzătoare celor două catene polipeptidice ale insulinei umane prin metoda triesterilor și au folosit ca vehicul plasmida *pBR322*.

Cum metodele de sinteză a genelor pe cale enzimatică și chimică au fost descrise anterior, acest capitol va trata în principal aspecte privind strategia construirii DNA recombinant purtător al genei insulinei.

IX.2.1. Aspecte structurale ale genei insulinei de șobolan

După cum este cunoscut, insulina de șobolan este compusă din două lanțuri (catene) polipeptidice (*A* și *B*), dar ea este produsul unei singure gene, întrucît precursorul insulinei este un polipeptid denumit proinsulină care conține cele două catene *A* și *B* legate între ele printr-un al treilea polipeptid denumit *C* (Steiner și colab., 1967). Aspectele structurale ale genei insulinei s-au complicat oarecum în momentul în care Chan și colab. (1976) au dovedit că produsul de traducere a mRNA specific insulinei nu este proinsulina, ci un precursor al proinsulinei, adică propreinsulina. Aceasta conține la capătul amino 20 acizi aminați în plus față de proinsulină. De aici s-a dedus că structura moleculei propreinsulinei de șobolan este:

NH_2-(prepeptid)-lanț *B*-(peptid *C*)-lanț *A*-COOH.

S-au precizat aceste aspecte, întrucît DNA recombinant conținînd gena insulinei de șobolan a conținut de fapt secvența nucleotidelor care codifică propreinsulina întreagă (Ullrich și colab., 1977). Această sinteză s-a realizat relativ ușor, întrucît utilizînd mRNA specific insulinei cu matriță și reverstranscriptază ca enzimă, produsul reacției a fost tocmai gena propreinsulinei.

IX.2.1.1. **DNA recombinant format din plasmida pMB9 și gena propreinsulinei de șobolan.** Schema generală de construire a DNA recombinant conținînd gena propreinsulinei de șobolan este redată în fig. 78. Principalele etape sînt:

a) *Sinteza genei propreinsulinei (pregătirea pasagerului).* În acest scop se extrage mRNA din insulele lui Langerhaus, se purifică pe coloană de oligodeoxitimidilat-celuloză, iar produsul pur este folosit ca matriță pentru sinteza de cDNA de către reverstranscriptaza din virusul mieloblastozei aviare. Enzima în prima etapă generează un hibrid, cDNA-mRNA, din care mRNA este îndepărtat prin hidroliza hibridului cu alcalii *. cDNA monocatenar rezultat este convertit în cDNA bicatenar tot cu ajutorul reverstranscriptazei din virusul mieloblastozei aviare. Reamintim că formarea de cDNA monocatenar se realizează în prezența de oligo $(dT)_{12-18}$ ca primer, în timp ce formarea de cDNA bicatenar este autocatalitică; cDNA monocatenar servește atît ca matriță, cît și ca inițiator.

cDNA bicatenar conține o „buclă" monocatenară care este înlăturată prin tratarea lui cu nuclează S_1 — enzima care atacă numai porțiunea monocatenară a cDNA. În urma acestui tratament a rezultat un cDNA bicatenar fără „buclă", avînd o catenă complementară față de mRNA specific propreinsulinei.

---

* Alcaliile diluate (~ 0,3 M) hidrolizează numai RNA

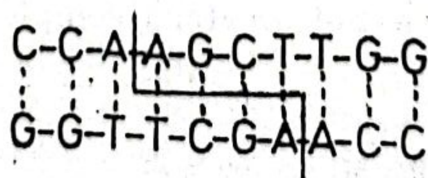
mRNA
5' ~~~~(A)x 3'
revers transcriptază
(A)x 3'
(T)y 5'
alcali
3'
(T)y 5'
revers transcriptază
(A)z 3'
(T)y 5'
nuclează S
5' —— (A)z 3'
3' —— (T)z 5'
T4 DNA ligază
5' CCAAGCTTGG 3'
3' GGTTCGAACC 5'
5' CCAAGCTTGG —— (A)z CCAAGCTTGG 3'
3' GGTTCGAACC —— (T)z GGTTCGAACC 5'
Hind III
5' pAGCTTGG —— (A)z CCA 3'
3' ACC —— (T)z GGTTCGAp 5'

plasmidă
centru Hind III
Hind III
fosfatază alcalină
$5'_{OH}$ AGCTT —— A 3'
3' A —— TTCGA$_{OH}$ 5'

T4 DNA ligază
AAGCTTGG —— (A)z CCAAGCTT
TTCGAACC —— (T)z GGTTCGAA
c DNA
DNA plasmidic

Fig. 78. Schema generală de construire a DNA recombinant din plasmida *pMB9* și gena preproinsulinei de șobolan (după *Ullrich* și colab., 1977).

b) *Pregătirea cDNA pentru inserția lui în plasmidă.* Pentru a facilita inserția cDNA în plasmidă, capetele sale au fost prelungite în ambele sensuri cu un decamer care conținea situsul de clivare pentru enzima de restricție Hin*d* III și anume:



Atașarea decamerilor de cDNA (ale cărui capete au devenit bicatenare netede, deoarece nucleaza S1 a îndepărtat părțile monocatenare) s-a făcut cu ajutorul DNA ligazei *T4*. În continuare, cDNA avînd decamerii legați la cele două capete, a fost tratat cu enzima de restricție Hin*d* III pentru a se obține capetele coezive terminale.

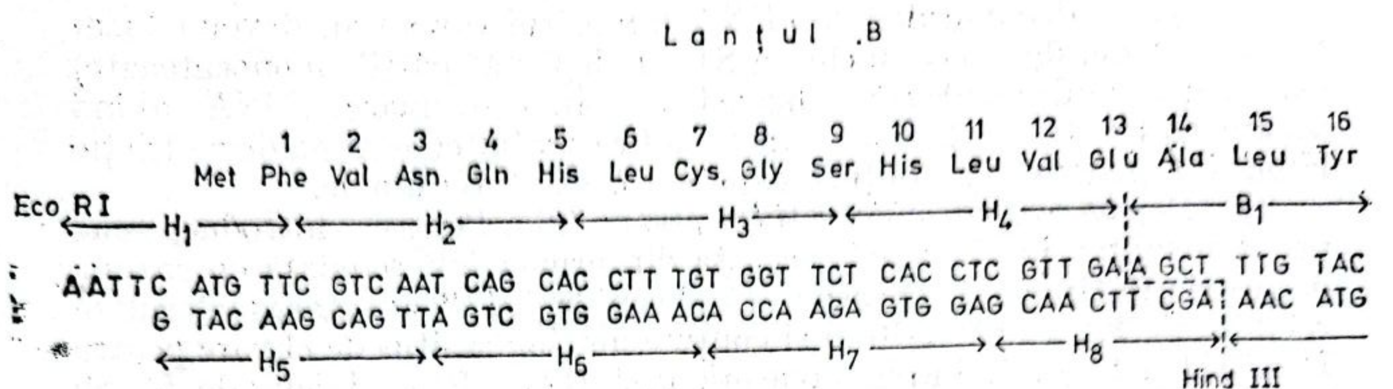
c) *Pregătirea plasmidei pMB9 (vehiculul)*. Pentru a introduce gena propreinsulinei în plasmidă, aceasta din urmă a fost scindată cu enzima de restricție Hin*d* III. Precizăm că plasmida *pMB9* are masa moleculară relativă de $3{,}5 \times 10^6$ daltoni și conține un singur situs de clivare pentru Hin*d* III și Eco *R*I. În plus, plasmida *pMB9* conferă celulelor de *E. coli* imunitate la colicină și rezistență la tetraciclină. Situsul de clivare cu Hin*d* III fiind situat în promotorul genei pentru rezistența la tetraciclină, DNA recombinant obținut cu ajutorul enzimei Hin*d* III devine sensibil la tetraciclină.

Plasmida tratată cu Hin*d* III trece într-o formă moleculară liniară avînd capetele monocatenare coezive. Atît pentru a împiedica autocircularizarea moleculei prin capetele sale coezive, cît și pentru a îmbunătăți randamentul de cuplare a plasmidei cu cDNA posedînd și el capete coezive create de Hin*d* III, s-au luat următoarele două măsuri: 1) s-au îndepărtat grupările fosforice 5' terminale de la plasmidă prin tratamentul ei cu fosfatază alcalină și 2) s-a lucrat cu exces molar de plasmidă față de cDNA.

d) *Legarea genei de plasmidă*. Ultima operație necesară construirii DNA recombinant a fost legarea covalentă a genei propreinsulinei de plasmida *pMB9*, ambele pregătite, după cum s-a văzut, în mod special în acest scop.

Legarea s-a făcut prin incubarea amestecului de plasmidă (în exces) cu cDNA în prezența DNA-ligazei *T4*. Amestecul rezultat a fost folosit pentru a transforma celulele de *E. coli* χ *1776*. Transformanții rezultați au fost selecționați și analizați pentru conținutul lor în DNA recombinant. Identificarea genei pasager din plasmidele selecționate s-a făcut atît prin testul hibridizării cu cDNA, cît și prin analiza secvențelor bazelor din DNA clonat.

IX.2.1.2. **DNA recombinant format din plasmida pBR322 și genele insulinei umane.** Pentru construirea de DNA recombinant conținînd genele insulinei umane, Crea și colab. (1978) au adoptat o altă strategie. Insulina umană fiind constituită și ea din două lanțuri polipeptidice *A* și *B*, unite între ele prin legături disulfurice, iar secvența acizilor aminați stabilită, aceasta a permis deducerea teoretică a secvenței nucleotidelor celor două gene corespunzătoare *A* și *B*. Genele au fost sintetizate chimic din 29 de oligodeoxiribonucleotide diferite avînd mărimi variabile între decameri și pentadecameri (fig. 79). De notat că genele au fost „proiectate" pentru sinteză, astfel încît, după introducerea lor în vehicul, să se exprime separat în *E. coli*, iar legăturile disulfurice dintre lanțurile



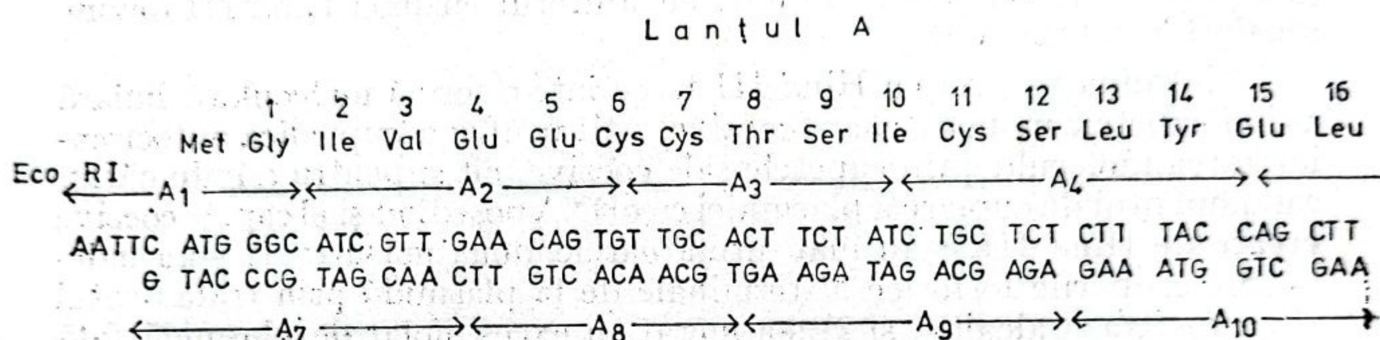


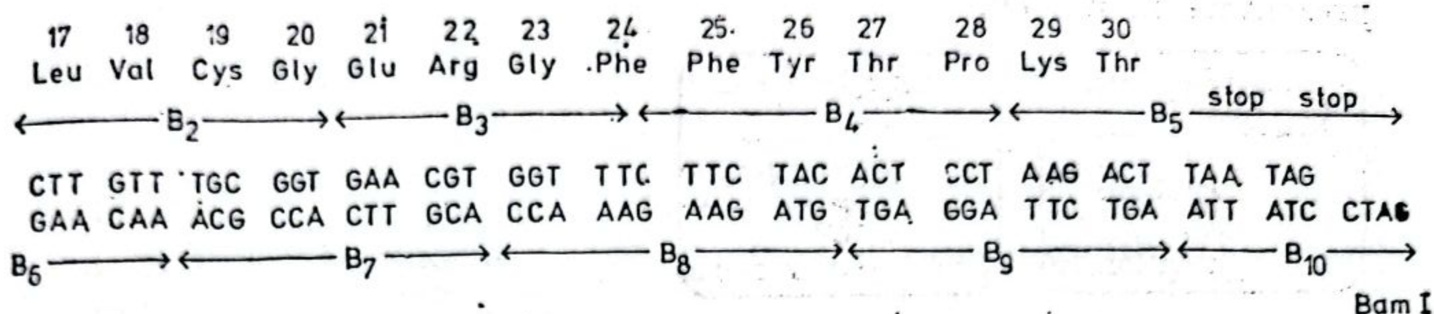
Fig. 79. Structura genelor *A* și *B*, corespunzătoare polipeptidelor *A* și *B* ale insulinei tidele insulinei umane. Gena *A* a fost sintetizată din 12 oligonucleotide, notate cu A_1—A_{10},

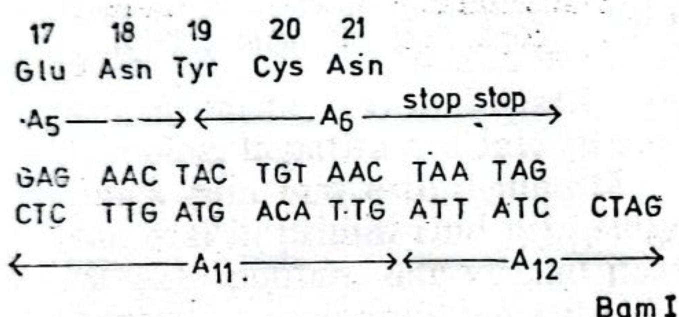
A și *B* să se formeze *in vitro*. Cu alte cuvinte, s-a mers pe ideea sintezei chimice a două gene (*A* și *B*), care introduse într-o plasmidă să determine sinteza unor polipeptide hibride, incluzînd și secvența acizilor aminați ai lanțurilor *A* și *B* ale insulinei umane.

Eliberarea lanțurilor *A* și *B* din polipeptidele hibride s-a făcut prin scindarea cu bromură de cianogen a precursorilor polipeptidelor acide. Insulina umană activă a rezultat prin formarea corectă *in vitro* a legăturilor disulfurice dintre *A* și *B* după purificarea lor.

Pentru a construi DNA recombinant din genele *A* și *B* ale insulinei umane pe de o parte, și ale plasmidei *pBR322*, pe de altă parte, fiecare genă sintetizată a avut la capetele ei 5′ secvențe de nucleotide monocatenare coezive specifice pentru enzimele de restricție Eco *R*I și Bam *H*I. Plasmida *pBR322* cu masa moleculară de 2,6 × 10^6 daltoni are cîte un situs pentru Bam *H*I și Eco *R*I. Ca atare, tratamentul plasmidei cu aceste enzime a generat capete coezive care, în prezența genelor *A* și *B* (avînd și ele aceleași capete coezive), au format DNA recombinant corespunzător.

IX.2.1.3. Îmbunătățirea randamentului de producere a insulinei. Dacă catena *A* (conținînd 21 de acizi aminați) și catena *B* (30 de acizi





umane sintetizate chimic. Rîndul de sus prezintă secvența acizilor aminați din polipep-
iar gena B din 18 oligonucleotide $H_1 - H_8$ și $B_1 - B_{10}$ (după *Crea* și colab., 1978).

aminați) sînt sintetizate separat în două tulpini bacteriene ca părți componente a unei proteine precursoare — β-galactozidaza, randamentul de producere a insulinei crește considerabil (Goedell și colab., 1979, Riggs și Itakura, 1979). Astfel, se poate ajunge ca aproximativ 20% din proteina bacteriană să fie constituită din proteina precursor β-galactozidază-insulină. Valoarea este considerată însă minimală pentru că se speră ca, în curînd, toată proteina sintetizată de bacteria transformată să conțină numai produsul dorit. Catenele de insulină sînt clivate din proteina precursoare prin tratament cu BrCN care este un reactiv specific de clivare a proteinelor la nivelul acidului aminat metionina. De reținut că sinteza genelor insulinei umane s-a făcut în așa fel încît la exprimare insulina produsă să se lege printr-o moleculă de metionină de β-galactozidază.

Catenele de insulină *A* și *B* eliberate separat în urma tratamentului au fost cuplate între ele prin oxidare cu aer. Aproximativ 80% din catene se cuplează în urma acestui tratament dînd naștere la insulină activă, fapt dovedit prin analiză chimică, imunologică și biologică. În urma acestor cercetări, producerea comercială a insulinei de bacterie pare a fi rezolvată. Dealtfel, două firme din S.U.A. — Genentech Inc. (South San Francisco, California) și Ely Lilly Inc. (Indianapolis,

Indiana) pun la punct producţia pe scară largă a insulinei (Riggs şi Itakura, 1979). Schema generală de producere a insulinei active este prezentată în fig. 80.

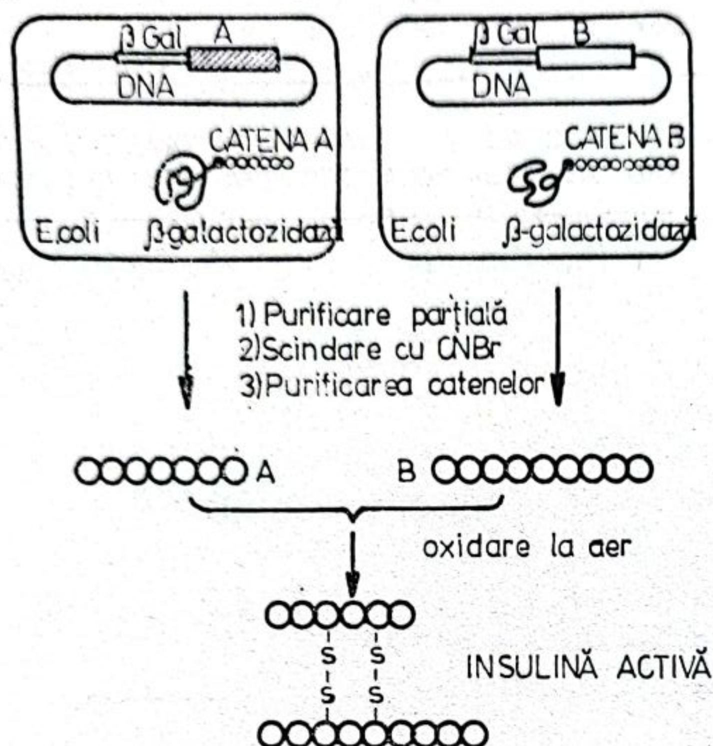


Fig. 80. Procedeul de producere a insulinei umane în *E. coli*. Se construiesc separat două tulpini de *E. coli*: una conţine gena *A*, iar a doua gena *B* a insulinei, împreună cu gena β-galactozidazei inserată în plasmidă (după *Riggs* şi *Itakura*, 1979).

IX.3. DNA recombinant conţinînd gene ale virusului hepatitei B (VHB)

Tehnologia DNA recombinant a fost introdusă în studiul virusului hepatitei B în două scopuri. În primul rînd, a contribuit la localizarea şi analiza structurii genelor. Aceste cercetări au avut ca rezultat elucidarea structurii primare a genomului VHB, stabilindu-se şi caracteristicile principale ale genelor implicate în codificarea componentelor sale (Galibert şi colab., 1979; Pasek şi colab., 1979).

În al doilea rînd, cercetările au fost iniţiate pentru a găsi modalitatea exprimării genelor VHB în celulele bacteriene, în vederea producerii pe scară industrială a antigenelor VHB. Această direcţie de cercetare are şi ea o importanţă deosebită, deoarece — aşa cum se cunoaşte — VHB nu poate fi cultivat în culturi celulare, iar în mod normal, el infectează numai omul şi maimuţa. Or, plasma donatorilor de sînge — sursa principală de obţinere a VHB — fiind limitată, tehnologia DNA recombinant oferă posibilitatea obţinerii de cantităţi suficiente de virus atît pentru studiul la nivel molecular al virusului, cît şi pentru producerea în cantităţi mari de antigene virale necesare diagnosticului şi preparării de vaccinuri.

Foarte recent, fragmentele de DNA VHB au fost clonate în celule de *E. coli* prin tehnologia DNA recombinant, utilizîndu-se plasmide

(Burrell şi colab., 1979) sau derivaţi ai bacteriofagului λ (Charnay şi colab., 1979). Unele celule transformate de DNA recombinanţi au produs antigene virale puse în evidenţă prin reacţii serologice specifice.

IX.3.1. Cîteva date despre virusul hepatitei B

Dintre cele trei virusuri care produc hepatita — virusul A, virusul B şi virusul non A non B — avînd caracteristici etiologice, structurale, imunologice şi epidemiologice distincte, virusul hepatitei B prezintă o importanţă cu totul deosebită. Virusul hepatitei B (VHB) infectează omul în proporţie ridicată. Statisticile arată că 10% din populaţia Europei de vest şi S.U.A. este purtătoare a unui marker serologic al VHB şi anume a antigenului de suprafaţă ($AgHB_s$) sau a anticorpilor corespunzători ($AcHB_s$) (Szmuness şi colab., 1978).

Mai mult chiar în unele arii din Africa tropicală şi sud-estul Asiei acest procent se ridică la 60% — 70% (Szmuness, 1975). Hepatita B — sau hepatita serică, hepatita post-transfuzională, hepatita prin ser homolog, hepatita asociată cu antigenul Australia, hepatita cu incubaţie lungă cum mai este denumită — este o boală transmisibilă parenteral sau oral în primul rînd prin sînge. În cele mai multe cazuri vindecarea se face spontan, dar virusul poate cauza complicaţii severe, cum ar fi hepatita fulminantă, hepatita cronică, ciroza şi uneori chiar hepatocarcinoame (Rodeker, 1975). Este important de semnalat că, în întreaga lume există cel puţin 120 de milioane de purtători cronici de $AgHB_s$, aşa-numiţii purtători sănătoşi (Szmuness, 1975).

IX.3.2. Structura virusului hepatitei B

Virionii hepatitei B au o structură complexă. Particulele au formă sferică cu diametrul de 42 nm şi sînt cunoscute în literatură de specialitate sub denumirea de *particule Dane*. Plasma pacienţilor infectaţi cu virusul hepatitei B şi chiar cea a unor donatori de sînge sănătoşi conţine particule Dane care, după proprietăţile lor serologice şi biochimice, sînt considerate virionii infectanţi ai hepatitei B. La suprafaţa particulelor există un înveliş care conţine antigenul de suprafaţă, denumit $AgHB_s$, iar în interiorul lor un miez *(core)* cu diametrul de 27 nm conţinînd al doilea antigen, denumit $AgHB_c$. Miezul mai conţine DNA viral cu masa moleculară de 2×10^6 daltoni şi o DNA polimerază DNA dependentă. Se pare că genomul viral codifică şi al treilea antigen — $AgHB_e$ — care se găseşte atît liber, cît şi asociat cu particulele Dane în plasma unor pacienţi (Ohori şi colab., 1979).

Specificitatea $AgHB_s$ este conţinută într-un singur polipeptid de 22.000 daltoni. Componentele polipeptidice adiţionale existente în $AgHB_s$ par să conţină însă aceleaşi specificităţi antigenice. Miezul

viral ($AgHB_c$) conţine cel puţin un polipeptid de 19 000 de daltoni şi posibil, cantităţi mici de componente polipeptidice cu masă moleculară mare. Specificitatea antigenică a acestor polipeptide nu este bine definită, dar cercetări recente sugerează că polipeptidul de 19 000 daltoni reacţionează cu anticorpi anti-HB_c. Antigenul $AgHB_e$, distinct din punct de vedere structural şi antigenic de $AgHB_s$ şi $AgHB_c$, apare sub forma unui complex de antigene, exclusiv în serurile $AgHB_s$ pozitive. (Robinson şi colab., 1979 b.)

Prezenţa $AgHB_s$ în sînge este o indicaţie că sîngele conţine virusul HB, astfel că $AgHB_s$ este considerat ca markerul specific al infecţiei cu virusul de tip B.

IX.3.3. Structura genomului virusului hepatitei B

Aşa cum s-a arătat, miezul virusului conţine o moleculă de DNA circulară bicatenară, cu o regiune monocatenară care ocupă în diferite molecule 15% — 45% din lungimea cercului. Se poate deci spune că acest DNA constă dintr-o catenă scurtă de lungime variabilă (1800 pînă la 2700 de nucleotide) şi dintr-o catenă lungă cu o lungime constantă de 3250 de nucleotide (Robinson, 1977). Catena lungă are o crestătură ***(nick)*** situată într-un loc unic, la o distanţă de 1860 de nucleotide spre dreapta de la situsul Eco RI din DNA VHB. Capătul 5′ al catenei scurte este într-un loc unic situat la aproximativ 1600 de nucleotide spre dreapta de la situsul Eco RI. Spre deosebire de acesta, capătul 3′ nu este fix, poziţia lui variind în diferite molecule. În regiunea moleculei de DNA de la capătul 3′ pînă la capătul 5′ (regiune monocatenară variabilă) acţionează DNA polimeraza, care determină sinteza unor molecule total bicatenare de DNA viral. Între capătul 5′ al catenei scurte şi crestătura din catena lungă există o zonă moleculară de aproximativ 260 de perechi de baze. DNA circular poate fi convertit în forme liniare prin încălzirea moleculei la 77°C în soluţie de NaCl 0,01M. Formele liniare astfel generate pot fi recircularizate prin incubare în NaCl 0,1M la 60°C (Robinson şi colab., 1975a).

Secvenţa completă — structura primară a genomului VHB — a fost determinată de Galibert şi colab. (1979). Aceasta constă din 3182 de nucleotide înlănţuite specific. Capacitatea de codificare, judecată după conţinutul în codoni *nonsens* a catenei lungi (L), este mai mare decît a catenei scurte (S). Autorii au localizat existenţa în genom a opt regiuni deschise, capabile de a codifica lanţuri polipeptidice mai mari de 100 de acizi aminaţi. Regiunea 6 este cea mai mare şi acoperă aproximativ 80% din genom. Gena *S*, care codifică polipeptidul I al $AgHB_s$, a fost localizată între coordonatele 95,1 şi 73,6 şi este conţinută în regiunea 7 (fig. 81).

Comparînd structura primară a unor mRNA virali sau celulari cu cea a fragmentelor de genom s-au pus în evidență o serie de secvențe de DNA remarcabile. Astfel, secvența 5'TATAAA — care ar putea corespunde unui semnal precizînd inițierea transcrierii — a fost găsită începînd cu nucleotidul 1269 de pe catena scurtă (S). Aceeași secvență a fost găsită odată și în catena lungă (L) la poziția nucleotidelor 689, 243.

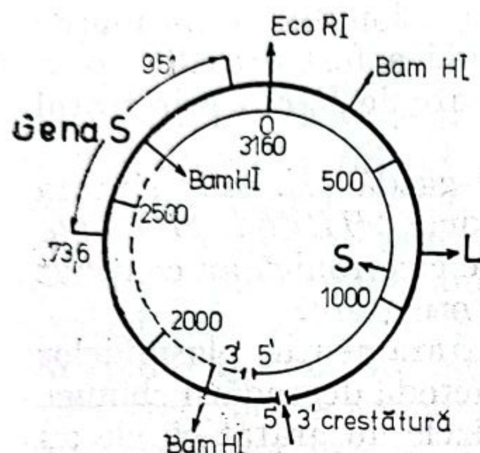


Fig. 81. Harta fizică a genomului virusului hepatitei B. Se prezintă și situsuri de acțiune a enzimelor de restricție Eco *RI* (originea hărții) și Bam *HI*.

Utilizîndu-se un program de calculator s-au pus în evidență și codonii *nonsens* de pe ambele catene DNA. Numărul și distribuția codonilor *nonsens* s-a dovedit a fi diferită în catenele L și S. Considerînd că în genom distribuția nucleotidelor este întîmplătoare s-a estimat că ar exista aproximativ 50 de codoni *nonsens*. Or, analiza secvenței a arătat că în catena L sînt 61, 60 și 40, iar în catena S 32, 29 și 15 codoni *nonsens* în fiecare fază ceea ce susține ideea rolului lor specific în funcția genomului.

IX.3.4. DNA recombinant conținînd gena pentru antigenele virusului hepatitei B

IX.3.4.1. **DNA recombinant din plasmida pBR322 și DNA VHB (obținut de Burrell și colab., 1979).** Genomul DNA din particule Dane a fost marcat cu ^{32}P prin reacția endogenă controlată de DNA polimeraza proprie, în prezența celor patru nucleotidtrifosfați. Apoi DNA marcat s-a extras din virioni și s-a scindat cu enzimele de restricție Eco *RI* și Bam *HI*. În paralel, plasmida *pBR322*, utilizată ca vehicul, a fost și ea scindată cu aceleași enzime de restricție pentru a avea aceleași capete coezive la vehicul și pasager. Fragmentul mare de DNA *pBR322*, rezultat în urma scindării cu enzimele de restricție mai sus menționate, împreună cu fragmentele de DNA ale genomului viral obținute în reacția de restricție, au fost amestecate și incubate în prezența DNA-ligazei *T*4 pentru a obține DNA recombinant.

Alți DNA recombinanți au fost obținuți din plasmida *pBR322* restrictată cu Pst I și din fragmente de DNA VHB preparate cu alte

enzime de restricţie şi fragmente rămase de la digestia cu Eco *R*I şi Bam *H*I.

Apoi, cu ajutorul polinucleotidfosforilazei terminale s-au adăugat capete coezive de oligo (dC) la fragmentele de genom şi capete coezive de oligo (dG) la plasmida restrictată de Pst I. Aceste componente amestecate au fost întrebuinţate pentru transformarea celulelor de *E. coli*. Prezenţa secvenţelor de DNA VHB în coloniile rezistente la antibiotice a fost confirmată prin tehnica de hibridizare a coloniilor. Exprimarea fragmentelor de DNA VHB inserate în plasmidă a fost dovedită prin punerea în evidenţă a antigenelor virale sintetizate de *E. coli* prin testul radioimunologic (RIA).

Toate plasmidele care au indus în celulele-gazdă *(E. coli)* sinteza de antigene virale identificate cu RIA (plasmidele *pHBV64*, *pHBV66*, *pHBV110* şi altele), examinate prin microscopie electronică au conţinut secvenţa nucleotidelor DNA VHB cu aceeaşi orientare.

Fragmentele de DNA VHB eliberate (prin tratamentul plasmidelor cu enzime de restricţie) au fost analizate prin metoda degradării chimice şi s-a stabilit secvenţa nucleotidelor lor. Analizele au arătat că ele au conţinut aproximativ 87% din secvenţele genomului viral (Pasek şi colab., 1979).

IX.3.4.2. **DNA recombinant din fagul λ-gt. WES şi DNA VHB (obţinut de Fritsch şi colab., 1978).** DNA viral a fost reparat prin reacţia enzimatică endogenă dirijată de DNA polimeraza virală în prezenţa celor patru nucleotidtrifosfaţi. După ce reacţia s-a terminat, DNA viral întreg a fost clivat cu Eco *R*I şi ataşat de vehiculul λ *gt.WES*. DNA recombinant rezultat a fost denumit Eco HBV DNA. Acest produs clonat în *E. coli* a fost utilizat pentru determinarea structurii primare a genomului VHB (Galibert şi colab., 1979).

IX.4. DNA recombinant conţinînd gena hemaglutininei virusului gripal

Progresele spectaculoase obţinute de tehnologia DNA recombinant în domeniul descifrării structurii şi secvenţei operonilor bacterieni, precum şi a elementelor de control, fac astăzi posibilă sinteza în celula bacteriană a unor cantităţi apreciabile de proteine (virale sau de altă natură), utilizabile în diferite scopuri. S-a deschis astfel calea producerii pe scară industrială a proteinelor virale (antigene) în vederea utilizării lor ca vaccinuri. Această perspectivă este extrem de importantă în situaţia actuală cînd, gripa, de exemplu, rămîne încă o infecţie majoră la om, cu multiple consecinţe sociale şi economice.

Astfel, s-a estimat că virusul gripal a determinat în anul 1918, direct sau indirect, moartea a 20 de milioane de oameni (Palese, 1977),

iar în anii 1968—70 virusul gripal de tip Hong Kong a fost responsabil de pierderea a 25 milioane de zile de muncă în Anglia, în timp ce pagubele produse de același tip de virus în S.U.A. (în anii 1968—1969) s-au ridicat la 3,8 miliarde de dolari (Emtage și colab., 1980). Rezultă că prevenirea prin vaccinări a epidemiilor de gripă este o problemă majoră a asigurării sănătății publice.

IX.4.1. Structura virusurilor gripale

Cu toate că virusurile gripale au fost izolate pentru prima oară în jurul anului 1930 (Shope, 1931—a izolat virus gripal de la porci, iar Smith și colab., 1933 — de la om), structura lor a fost recent stabilită. Se cunosc trei tipuri diferite de virusuri gripale, notate cu A, B și C. Primele două sînt mai importante, deoarece produc infecții severe la om. În același timp ele sînt bine caracterizate atît biochimic, cît și genetic. Al treilea tip nu este încă suficient de studiat și cunoscut. Clasificarea celor trei tipuri s-a făcut pe baza proprietăților imunologice specifice ale proteinelor lor interne și anume a proteinei nucleocapsidei (NP) și a proteinei membranei interioare (M). În general, particulele virale au o formă sferică (diametrul 100 nm), dar există și forme filamentoase sau pleomorfe. Compoziția chimică a virusurilor gripale de tip A și B este următoarea: RNA 1%, hidrați de carbon 7%, lipide 22% și proteine 70%. Analiza componentelor a precizat, printre altele, că RNA este monocatenar și segmentat. Electroforeza în gel de poliacrilamidă a arătat că virusurile gripale de tip A și B conțin cîte 8 segmente de RNA (Pons, 1976; Ritchey și colab., 1976). Pentru virusul gripal de tip C s-au găsit numai patru segmente de RNA (Palese, 1977).

Fiecare tip de virus are segmente specifice de RNA, iar studiul efectuat pe diferiți recombinanți privind corelația mărimii lor cu aceea

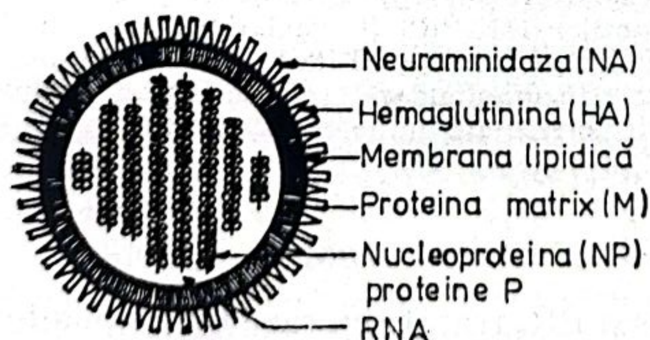


Fig. 82. Prezentarea schematică a structurii virusurilor gripale de tip A (după *Palese*, 1977).

a proteinelor, a permis identificarea funcției fiecărui segment de RNA. S-a ajuns astfel la concluzia că genomul virusurilor gripale de tip A și B este alcătuit din 8 segmente de RNA, fiecare segment reprezentînd de fapt o genă care controlează sinteza unei componente proteice a virusului. Fig. 82 prezintă schematic componentele virusului gripal de tip A sau B.

La suprafaţa virusului se găsesc distribuite ca nişte spice două componente glicoproteice: hemaglutinina şi neuraminidaza. Ele sînt fixate în membrana lipidică exterioară a virusului, care la rîndul ei înveleşte membrana internă sau proteina matrix (M) a virusului. În interiorul particulei se găseşte nucleocapsida care conţine segmentele de RNA complexate cu proteine (nucleoproteine) şi proteinele P implicate în activităţile polimerazice ale virusului.

IX.4.2. Cartarea genei hemaglutininei

Pentru a identifica atît genele specifice, cît şi produsele genelor, Palese şi Schulman (1976), primii cercetători care au cartat genele virusurilor gripale, au folosit strategia prezentată în continuare. Mai întîi s-au obţinut virusuri recombinante, prin coinfecţia celulelor cu două virusuri gripale parentale bine caracterizate: virus PR_8 şi Hong Kong (HK). Apoi s-a efectuat selecţionarea virusurilor cu antiser antihemaglutinină PR_8 şi antineuraminidază HK, ceea ce a determinat ca recombinantul izolat să conţină hemaglutinină HK şi neuraminidază PR_8. Mai departe, parentalul HK a fost iradiat cu raze UV; în urma acestui tratament cei mai mulţi recombinanţi viabili obţinuţi, după selecţia cu serul anti, au avut hemaglutinina de la parentalul HK şi toate celelalte gene de la parentalul PR_8 netratat cu raze UV. Invers, recombinantul PR_8—HK, conţinînd gena hemaglutininei PR_8 şi neuraminidaza HK,

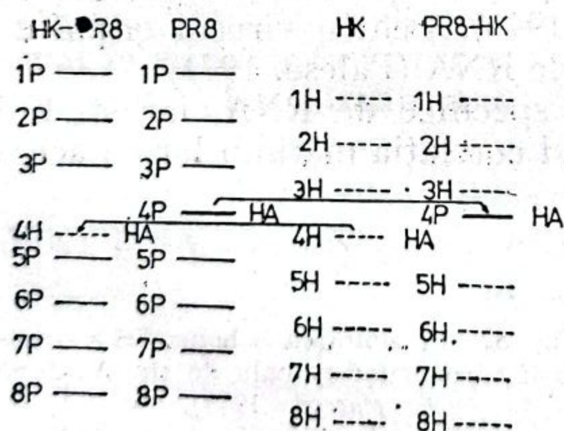


Fig. 83. Strategia utilizată pentru identificarea genei hemaglutininei. Sînt prezentate genele virusului APR8/34 şi A/HK/8/68 şi a recombinanţilor HK-PR8 (hemaglutinină HK şi neuraminidază PR8) şi PR8-HK (hemaglutinină PR8 şi neuraminidază HK), sub formă de linii orizontale (după *Palese*, 1977).

s-a obţinut din virusurile HK şi virusul PR_8 tratate cu raze UV, bineînţeles după selecţia făcută — de data aceasta — cu antiser antihemaglutinina HK şi antineuraminidaza PR_8. Analiza electroforetică în gel de poliacrilamidă a acizilor ribonucleici din virusurile parentale şi din recombinanţi a arătat în mod clar că în fiecare caz numai segmentul de RNA notat cu 4 (numărul 1 reprezentînd segmentul cu mobilitatea electroforetică cea mai mică) este modificat, ceea ce a constituit dovada că el reprezintă de fapt gena hemaglutininei (fig. 83).

Prin urmare, segmentul de RNA numărul **4** este gena de interes care se izolează, iar pe modelul ei se sintetizează o copie, adică DNA complementar.

IX.4.3. Structura hemaglutininei

Hemaglutinina este principala componentă virală de suprafaţă implicată în reacţiile imunologice specifice infecţiei gripale. Subunitatea funcţională a hemaglutininei este reprezentată de un spic avînd o formă de baston, aflat pe suprafaţa virusului (fig. 78). Ea este o glicoproteină triangulară, cu masa moleculară de aproximvtiv 250000 daltoni şi este compusă din trei monomeri de aproximativ 80000 daltoni fiecare (Wiley şi colab., 1977). S-a stabilit că monomerii de hemaglutinină sînt sintetizaţi sub formă de lanţuri polipeptidice conţinînd la capătul N-terminal precursori de peptide. În cazul virusului gripal de tip FPV (pestă aviară) precursorul polipeptidic este format din 18 acizi aminaţi (Porter, 1979). Probabil că în timpul maturării şi asamblării virusului, pre-hemaglutinina trece în hemaglutinină **1** şi hemaglutinină **2**, care rămîn legate între ele prin legături disulfurice (Laver, 1971).

IX.4.3.1. **Structura primară a genei hemaglutininei.** Primele informaţii despre structura primară a genei hemaglutininei s-au obţinut indirect prin analiza secvenţei peptidelor din hemaglutinina matură a tulpinilor de virus gripal de tip H1N2 şi H2N2 (Ward şi Dopheide, 1979; Waterfield şi colab., 1979).

A doua variantă utilizată în acelaşi scop a fost tot indirectă, bazată pe tehnologia DNA recombinant. Ea a constat în sinteza DNA complementar al genei hemaglutininei, clonarea cu ajutorul unei plasmide şi analiza secvenţei nucleotidelor sale (Porter şi colab., 1979).

S-au ales aceste variante ocolindu-se analiza directă a structurii întrucît atît secvenţa acizilor aminaţi dintr-o proteină, cît şi secvenţa nucleotidelor dintr-un DNA sînt mult mai uşor de analizat decît secvenţa nucleotidelor unui RNA înalt polimerizat, cum este şi cazul genei hemaglutininei.

Dintre cele două variante indirecte prezentate cea de a doua are o importanţă deosebită. Cu ajutorul ei se poate prezice secvenţa completă a acizilor aminaţi din hemaglutinina matură şi, în acelaşi timp, se indică secvenţa oricărui peptid care este îndepărtat în timpul maturării ei. În plus, ea permite cunoaşterea existenţei în genă a unor secvenţe netraduse *(introni)* care întrerup regiunea codificată a genei.

Cu ajutorul tehnologiei DNA recombinant Porter şi colab. (1979) au determinat pentru prima dată structura primară a genei hemaglutininei virusului pestei aviare. Acest virus, la fel ca şi celelalte virusuri gripale, este un virus cu catenă negativă, avînd genomul format din

8 segmente de RNA, dintre care două segmente codifică antigenele de suprafață (hemaglutinina — gena 4 și neuraminidaza).

Gena hemaglutininei s-a dovedit a avea lungimea de 1742 nucleotide, cu 300 de nucleotide mai puțin decît valoarea obținută anterior pe baza migrării RNA în gel de poliacrilamidă cu formamidă. Regiunea codificată începe cu tripletul AUG și este terminată de un codon *nonsens* UAA. În jurul nucleotidelor 1030—1050 se găsește o secvență neobișnuită de purine, dintre care cele mai multe codifică peptidul care colectează cele două subunități HA_1 și HA_2 ale hemaglutininei.

Analiza genei hemaglutininei* a arătat că în timpul transcrierii RNA viral *in vivo*, mRNA determină sinteza mRNA viral adăugînd la fiecare capăt 5′ cîte 10—15 nucleotide suplimentare. În schimb, la celălalt capăt transcrierea se termină prematur, probabil la secvența U, care se situează între nucleotidele 17 și 23 de la capătul 5′ al RNA viral matriță. Astfel, regiunile 5′ și 3′ necodificate conțin 31—36 și respectiv 9 nucleotide. Rezultă că regiunea 3′ este scurtă în comparație cu regiunile corespunzătoare a altor mRNA din celulele eucariote.

Gena hemaglutininei nu conține secvența semnal 5′—AAUAAA-3′, care a fost găsită în regiunea 3′ necodificată a diferitelor mRNA de origine eucariotă. O situație asemănătoare s-a găsit însă și în cazul mRNA din virusul stomatitei veziculare și din virusurile picorna.

O altă caracteristică a genei este aceea că la capătul 3′ din 15 nucleotide 12 sînt identice, fapt semnificativ care ar putea constitui semnalul pentru inițierea replicării. De remarcat și particularitatea genei care în regiunea ei 5′ necodificată, lîngă semnalul AUG, să conțină o secvență de nucleotide omoloagă cu locul de legare de ribozomi a mRNA din procariote (mRNA timpuriu din bacteriofagul *T7*, de exemplu).

Gena hemaglutininei conține o secvență caracteristică bogată în purine AGGGG, care interacționează cu capătul 3′ al rRNA 16S din procariote. Ea este urmată imediat de secvența UUACA, situație găsită și la unele procariote. Aceste caracteristici, împreună cu experiențele de exprimare a genei hemaglutininei în sistem bacterian *(E. coli)*, susțin ideea că hemaglutinina are un pronunțat caracter procariot!

IX.4.4. Sinteza genei hemaglutininei

Pentru a obține copia genei hemaglutininei, adică DNA complementar (cDNA) bicatenar corespunzător, capabil de a fi inserat într-o plasmidă, s-a pornit de la RNA total din virion și nu de la segmentul de RNA 4 (gena hemaglutininei) separat de celelalte segmente de RNA

---

* Structura primară a genei hemaglutininei nu o prezentăm, deoarece numai prezentarea schematică a celor 1740 de nucleotide care o compun ar ocupa două pagini de text!

RNA viral total a fost întîi poliadenilat, iar cele două catene de cDNA s-au sintetizat cu reverstranscriptază, iar zona (bucla) monocatenară a fost îndepărtată prin tratament cu nuclează S1. Capetele cDNA bicatenar rezultat au fost reparate cu DNA polimerază I, în prezența celor patru deoxitrifosfați. Paralel, s-a marcat cu kinază un linker sintetic pentru situsul enzimei de restricție Hin*d* III (d CCAAGCTTGG), linker ce a fost apoi legat cu DNA-ligază *T*4 de amestecul de gene. Excesul de linker nelegat s-a îndepărtat prin digestie cu Hin*d* III și cromatografie pe coloană de Sephadex G-150. Produsul exclus de pe coloană, care a conținut genele, a fost utilizat la legarea de plasmida *pBR322*. În acest scop, DNA *pBR322* a fost hidrolizat cu Hin*d* III și tratat cu fosfatază alcalină bacteriană. După îndepărtarea enzimei cu etanol, DNA plasmidial liniar defosforilat s-a legat la amestecul de gene cu ajutorul DNA-ligazei *T*4. Apoi produsul rezultat a fost utilizat la transformarea tulpinii *E. coli K12HB*101. Cultura bacteriană a fost trecută pe agar L în prezență de ampicilină. DNA plasmidial s-a izolat și purificat din coloniile sensibile la tetraciclină, iar apoi s-a examinat prin electroforeză în gel de agaroză 1,4%, după tratament cu enzima de restricție Hin*d* III.

Pentru a stabili care genă virală a fost inserată în fiecare plasmidă, DNA plasmidial a fost hibridizat cu gene virale marcate cu ^{32}P, separate electroforetic. Din 13 colonii Tc^r obținute, purtătoare de gene inserate, una — denumită $pBR322\text{-}FPV_{4-10}$ — a conținut un fragment suplimentar de DNA, lung de aproximativ 1700 de nucleotide. Această colonie a hibridizat specific cu gena **4** (pentru hemaglutinină) marcată cu ^{32}P. Procentul de hibridizare a coloniei cu gena **4** a fost de 59,7%. Cu celelalte gene hibridizarea a fost nulă sau mai mică de 3%, ceea ce a demonstrat că plasmida $pBR322\text{—}FPV_{4-10}$ conține copia genei hemaglutininei. În continuare această colonie a fost amplificată, iar analizele au confirmat că ea a conținut copia genei pentru hemaglutinină inclusă în plasmidă.

IX.4.5. Obținerea de DNA recombinant conținînd gena hemaglutininei

Pentru a obține un DNA recombinant conținînd o genă care în mod natural este produsă de celulele eucariote, DNA capabil să se exprime în bacterie, este neapărată nevoie ca atît gena în care este inserat pasagerul să conțină semnalele de control adecvate, cît și faptul ca gena să fie plasată în poziție corectă pentru a fi citită și tradusă. Gena trebuie să fie „în fază", adică să fie situată lîngă situsul de legare la ribozomi, în dreapta promotorului și, în același timp, să conțină semnalele de pornire și oprire a sintezei.

În acest scop s-au realizat o serie de vectori avînd la bază plasmiad *pBR322 (pWT111, pWT121* și *pWT131)*, vectori care la situsul Hin*d* III conțin un fragment de DNA avînd: regiunea de control a operonului de triptofan, zona de codificare a situsului de legare la ribozom și a primilor 7 aminoacizi ai genei *trpE*. Acești vectori au proprietatea de a asigura citirea în fază corectă a oricărei gene inserate (Tacon și colab., 1980).

Astfel, secvența nucleotidelor în jurul situsului Hin*d* III al vectorului *pWT121* și a unei părți din gena hemaglutininei virusului pestei aviare (FPV) este:

pWT121—ATG, CAA, ACA, CAA, AAA, CCG, ACT, CCA, AGC, TCC,
Met Glu Thr Glu Lys Pro Thr Pro Ser Lys
specificați de *trpE*
AAG, CTT ...
Leu 10 20
FPV-HA-A AGCTTGG$(T)_{19}$AGCAAAAGCAGGGGTTACAAAATG,
Met

iar gena FPV-HA clonată în *pWT121* orientat în poziția corectă (spre dreapta) va produce: —40 —30
ATG, CAA, ACA, CAA, AAA, CCG, ACT, CCA, AGC, TCC, AAG,
Met Glu Thr Glu Lys Pro Thr Pro Ser Ser Lys
specificați de *trpE*
—20 —10 10
CTT, GGT, TTT, TTT, TTT, TTT, TTT, TTT, AGC, AAA,
Leu Gly Phe Phe Phe Phe Phe Phe Ser Lys
20
AGC, AGG, GCT, TAC, AAA, ATG, AAC, A...
Ser Arg Gly Tyr Lys Met Asn
FPV pre-HA

În ceea ce privește regiunea pre-AUG, conținînd semnalul de start al mRNA specific hemaglutininei, secvența genei are asigurat potențialul de legare prin legături de hidrogen în modul următor:

RNA-16S: 5′...G G A U C A C C U C C U U A—OH
A U U G G G G A C G A A A A...5′
C A A A *AUG*... 3′

Reamintim că situsul de legare a ribozomului — care interacționează cu mRNA în cursul sintezei proteice — se găsește localizat pe RNA 16S din subunitatea mică și are secvența de nucleotide menționată anterior.

Structura genei și a fragmentului de DNA inserat pentru a asigura expresia ei permite sinteza unei proteine hibride constînd din următoarele fragmente: a) un capăt conținînd șapte aminoacizi ai antranilatsintetazei; b) șase aminoacizi specificați de linkerii de DNA; c) șase rezidii

de fenilalanină din regiunea $(T)_{19}$ ai genei FPV; d) şapte aminoacizi din porţiunea 5' netradusă a genei HA; e) 558 de aminoacizi ai proteinei hemaglutininei şi ai pre-peptidului său şi, final, f) cinci aminoacizi specificaţi de linkerul Hin*d* III de la capătul C-terminal. În total sînt 589 de aminoacizi, care dau naştere unei proteine cu masa moleculară totală de 69000 (Emtage şi colab., 1980).

IX. 4.5.1. **Inserţia genei hemaglutininei în plasmida pWT121.** Plasmida *pWT121* a fost restrictată cu Hin*d* III pentru a fi trecută în forma liniară. Tratamentul ei ulterior cu fosfatază alcalină bacteriană a determinat defosforilarea, adică se îndepărtează capetele 5'-fosfat ale vehiculului. După extracţie cu fenol şi precipitare cu etanol, plasmida a fost legată cu ajutorul DNA-ligazei *T*4 de gena HA. Produsul obţinut a fost apoi utilizat pentru transformarea tulpinii *E. coli K12 HB101*. S-au obţinut 47 de transformanţi Ap^r, iar dintre aceştia 19 au fost tetraciclino-sensibili (Tc^s) restul fiind Tc^r. S-au selecţionat 12 colonii (3 Tc^s şi 9 Tc^r) pentru caracterizare ulterioară. Analiza electroforetică în gel de agaroză a DNA plasmidic tratat cu Hin*d* III a arătat că cinci din cele nouă colonii Tc^r au conţinut DNA plasmidial cu inserţii, celelalte patru conţinînd numai plasmida parentală.

Coloniile Tc^r conţinînd DNA adiţional inclus au fost cultivate şi analizate pentru a se determina atît orientarea genei HA incluse în plasmidă, cît şi pentru a se testa exprimarea genei. Orientarea genei a fost stabilită prin tratarea plasmidei cu enzime de restricţie. Orientarea putea fi spre dreapta (*D*) sau spre stînga (*S*), în funcţie de direcţia transcrierii genei necesară pentru producerea de hemaglutinină. Orientarea *D*

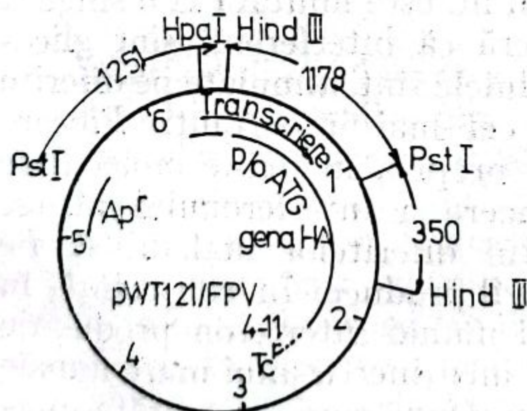


Fig. 84. Structură DNA recombinant $pWT121/FPV_{4-11}$ format din plasmida *pWT121* şi gena hemaglutininei pestei aviare (FPV) (după *Emtage* şi colab., 1980).

(în sensul acelor de ceasornic) faţă de promotorul *TrpE* era obligatorie pentru ca exprimarea genei HA să poată avea loc. Tratamentul plasmidei denumită $pWT121\text{-}FPV_{4-11}$ (R) (schematic prezentat în fig. 84) cu enzime de restricţie a demonstrat că gena HA a virusului pestei aviare FPV a fost inserată în poziţia corectă (*D*), fiind localizată între cele două situsuri specifice Hin*d* III.

IX. 4.5.2. **Exprimarea genei hemaglutininei în E. coli.** Pentru a stabili exprimarea genei HA, coloniile conţinînd DNA recombinant de

tipul $pWT121-FPV_{4-11}$ cu gena HA inclusă în plasmidă au fost analizate prin metoda imunologică în fază solidă. În acest scop, coloniile crescute individual au fost colectate și lizate cu lizozim și Triton X-100. Secvențele de HA prezente au fost legate de un tub de polistiren acoperit IgG specific pentru HA din pesta aviară. Antigenul legat a fost detectat prin incubare cu ^{125}I-antiFPV-HA.

Din datele imunologice obținute s-a calculat cantitatea absolută de proteină asemănătoare hemaglutininei, produsă de bacterie. Pe baza randamentului maxim de 60 ng per 50/μl de lizat bacterian și a concentrației în proteină de 160 μg/ml s-a estimat că hemaglutinina reprezintă 0,75% din proteina totală. Aceasta înseamnă că proteina cu masa moleculară de 81000 (deci hemaglutinina) constituie 2—3% din totalul proteinelor sintetizate.

IX.5. DNA recombinant conținînd gena interferonului

IX.5.1. Generalități. Definiție

În momentul de față interferonii sînt agenții antivirali (și chiar antitumorali) cei mai puternici care există, motiv pentru care producerea lor a devenit un obiectiv principal al industriei de medicamente. Stewart și colab. (1980) definesc interferonul ca „o proteină care exercită activitate antivirală nespecifică cel puțin în celulele omoloage, prin procese metabolice celulare care implică atît sinteză de RNA, cît și sinteză de proteine". Din această definiție, mai degrabă funcțională decît structurală, rezultă că activitatea interferonului nu este limitată la o singură specie moleculară. În general, se consideră că interferonii sînt glicoproteine care se sintetizează atunci cînd celulele sînt stimulate pe diferite căi, virusurile fiind inductorii naturali cei mai importanți. Fiecare specie de animal sintetizează interferonii proprii, în forme moleculare specifice. Această specificitate de producere a interferonului atrage după sine ca utilizarea lui în tratamentul diferitelor maladii să fie restrînsă numai la specia de organism care îl produce. În consecință, în scopuri clinice, pentru om se poate folosi numai interferon produs de celule umane, ceea ce implică cultivarea și menținerea unui mare număr de celule umane producătoare de interferon. După cum se va arăta ulterior tehnologia DNA recombinant a oferit însă posibilitatea producerii de interferon uman chiar în celula bacteriană.

IX.5.2. Clasificarea interferonilor umani (Hu-IFN)

Avalanșa de informații din domeniul interferonilor a adus noi și noi precizări în ceea ce privește structura și proprietățile lor. În consecință, asistăm la modificarea continuă a clasificării lor. De exemplu,

anul trecut (1980), Stewart și colab. au împărțit interferonii umani în trei grupe principale: α, β și γ. În același an însă, dar cîteva luni mai tîrziu, a apărut lucrarea lui Streuli, Nagata și Weissmann, care arată că la om există cel puțin trei tipuri de interferon α și anume: Hu-IFNα_1, Hu-IFNα_2 și Hu-IFNα_3. Mai mult chiar, ei precizează că studiul genomului DNA pune în evidență prezența a cel puțin opt gene implicate în sinteza interferonilor. Este deci posibil ca, în curînd, să se descrie și caracteristicile altor tipuri de interferoni umani, iar clasificarea actuală să fie completată sau chiar revizuită. În cele ce urmează se va încerca respectarea — pe cît posibil — a clasificării lui Stewart și colab. (1980). Astfel, conform acestei clasificări, interferonii produși de leucocitele stimulate de virus (Sendai sau Newcastle) este predominant de tip α, în timp ce cei produși de celulele limfoblastoide conțin cca 90% tip α și 10% tip β. Fibroblastele umane produc, în principal sau exclusiv, interferon de tip β.

Atît structural, cît și biologic, interferonii α și β sînt diferiți. De menționat că, anterior, interferonii α și β au fost introduși în aceeași categorie, denumită interferon de tip I acido-stabil.

Interferonii de tip γ sau interferonii imuni sînt produși de limfocitele T ca răspuns al acțiunii unor mitogeni sau a unor antigene. Ei sînt serologic distincți de interferonii α și β. În plus, sînt acido-labili (Johnson și Baron, 1976).

IX.5.3. Unele proprietăți moleculare ale interferonilor

Interferonii α și β au masa moleculară mică, în jur de 20.000 daltoni, în timp ce interferonii γ par să fie heterogeni, conținînd și molecule cu masă moleculară ridicată (Goldstein și colab., 1979). Această heterogenitate este determinată, cel puțin în parte, de gradul de glicozilare a moleculelor respective. Ea ar putea să apară în timpul biosintezei sau în etapele ulterioare, ca o consecință a proceselor de degradare. Este posibil ca unul și același tip de polipeptid să fie în mod diferit glicozilat sau să existe diferite specii de polipeptide de interferoni glicozilate în mod specific. Nu este însă exclus ca fiecare dintre aceste procese în parte sau combinația lor să stea la baza heterogenității interferonilor.

Proprietățile fizico-chimice ale interferonilor variază în funcție de sursă (specie animală, tip de celule) și de metoda de inducție. Pentru acest motiv, nu există o metodă universală de purificare a interferonilor. Unii interferoni însă au situsuri pentru interacțiuni hidrofobe, ceea ce a făcut ca acestea să fie frecvent utilizate pentru purificarea interferonilor. Interacțiunile hidrofobe par să fie responsabile de legarea interferonilor de Phenyl-Sepharose CL-4B, ConA—Sepharose, albumin-agaroză, Blue Sepharose CL-6B.

IX.5.4. Modul de acţiune a interferonilor (efectul antiviral)

Dianzani şi Baron (1977) susţin că interferonul acţionează ca agent antiviral la nivelul procesului de traducere a informaţiei genetice. Ataşîndu-se de receptorii specifici de pe suprafaţa celulei, interferonul induce producerea de enzime celulare care blochează replicarea virală, inhibînd în principal traducerea mRNA viral. Acest proces de inhibiţie a traducerii are loc la nivelul iniţierii sau elongării catenelor polipeptidice şi este de natură enzimatică.

Se consideră că intervenţia interferonului se produce pe cel puţin trei căi diferite. Prima cale ar fi cea mediată de o protein-kinază indusă de interferon, iar activarea ei are nevoie de prezenţa unui RNA bicatenar sau numai de unele zone moleculare bicatenare ale unui RNA monocatenar. Odată activată, kinaza fosforilează şi prin aceasta inactivează factorul ribozomal de iniţiere, cunoscut sub denumirea de IF_2. Prin inactivarea IF_2 se împiedică formarea complexului de iniţiere stabil necesar sintezei proteinelor virale (Samuel, 1979).

A doua cale de acţiune a interferonului la nivelul traducerii ar consta în formarea de acid 2',5'-oligoadenilic de către oligonucleotidsintetază, enzimă indusă specific de interferon (Kerr şi Brown, 1978). Formarea acidului 2',5'-oligoadenilic este şi ea activată de RNA bicatenar. Odată ce acest acid a fost sintetizat, el activează o endonuclează celulară latentă care degradează mRNA viral şi, prin aceasta, sinteza virusului. Acţiunea este selectivă, endonucleaza celulară nu acţionează şi asupra mRNA celular, care este probabil protejat în complexul poliribozomal format cu complexul de iniţiere stabil conţinînd IF_2 activ.

A treia cale pare să se manifeste la nivelul elongaţiei catenei polipeptidice. Interferonul determinînd o deficienţă la tRNA celular inhibă elongaţia. Această deficienţă pare a fi mediată de către fosforilaza celulară a cărei activitate crescută determină degradarea nucleotidelor terminale ale tRNA (Schmidt şi colab., 1979).

După alţi autori interferonul ar acţiona ca agent antiviral la nivelul transcrierii RNA viral şi nu la nivelul traducerii informaţiei sale (Oxman, 1977) sau la nivelul asamblării şi eliberării virusului (Friedman, 1978).

De asemenea, s-a stabilit că interferonul are o importanţă deosebită ca modulator imun. În anumite condiţii s-a observat că interferonul stimulează activitatea naturală a celulelor de a apăra organismul *(natural killer activity)*, producînd şi creşterea activităţii limfocitelor T (Hirsch şi Swartz, 1980).

În concluzie, deşi interferonii sînt determinanţii esenţiali ai rezistenţei celulare faţă de infecţia virală, încă nu este stabilit dacă efectele clinice ale interferonului sînt modulate prin mecanisme antivirale sau imunologice. Este însă cert că pacienţii cu sistem imunitar intact beneficiază de tratamentul cu interferon exogen mai mult decît cei cu sistemul imunitar compromis.

IX.5.5. Metode convenţionale de producere a interferonului

Dintre metodele convenţionale cea mai eficientă s-a dovedit a fi cea preconizată de grupul lui Cantell (1973). Ea se bazează pe producerea de interferon de către leucocitele umane (rezultate ca produs secundar la prelucrarea sîngelui de la donatori), infectate cu virus. Metoda este extrem de laborioasă, iar randamentul ei este limitat. Principalele etape ale acestei metode sînt următoarele: se recoltează sîngele, iar leucocitele se separă prin centrifugare. Leucocitele astfel obţinute sînt apoi cultivate în condiţii speciale, iar producerea de interferon este stimulată prin infectarea lor cu virus Sendai. După concentrări preliminare, prin precipitare cu KSCN, interferonul brut rezultat poate fi utilizat — sub această formă — în clinică. Extracţia cu etanol a proteinelor precipitate din preparatul crud şi precipitările fracţionate ale proteinelor inerte la *p*H ridicat au două consecinţe: pe de o parte, puritatea interferonului creşte, iar pe de altă parte se pierde parţial din activitatea lui. Produsul final conţine aproximativ 10^6 unităţi/mg proteină, cu toate că el are gradul de puritate de numai 0,1%. În condiţii optime, din 600 ml de sînge recoltat se pot obţine aproximativ 2×10^6 unităţi de interferon, folosind ca inductor virusul Sendai. După cum s-a arătat metoda este limitată. Într-un singur an (1976), printr-o organizare metodică, folosind sîngele a 65 000 de donatori, s-a reuşit obţinerea doar a 10^3 megaunităţi (o megaunitate are 10^6 unităţi) de interferon crud (Cantell şi Strander, 1977). Producerea interferonului prin metoda lui Cantell a avut însă un rol esenţial pentru promovarea cercetărilor clinice şi, în special, a acelora care au fundamentat utilizarea lui în tratamentul unor forme de cancer.

Într-o variantă mai nouă, prepararea totală a interferonului din leucocite se face prin precipitarea la *p*H 4,5 cu KSCN, urmată de dializă, gel-filtrare şi cromatografie pe coloană de cupru chelat, Blue Dextran-Sepharose, Sepharose cuplată cu anticorpi (Berg şi Heron, 1979). Purificarea conduce la un interferon de tip Hu-IFNα_1, cu activitatea specifică de 2×10^9 unităţi/mg proteină, iar randamentul este de 50%. Acelaşi tip de interferon a fost preparat şi printr-o metodă mai simplă, bazată tot pe precipitarea în mediu acid cu KSCN, urmată numai de două etape adiţionale: una de cromatografie pe Sepharose cuplată cu anticorpi şi a doua de gel-filtrare. Activitatea interferonului astfel obţinut este mai mică ($1,1 \times 10^7$ unităţi/mg proteină), dar randamentul este de 100% (Törmä şi Pauker, 1976).

Producerea interferonului β se realizează în culturi de fibroblaste umane normale. Ca inductor de interferon se utilizează molecula de RNA bicatenar; tratamentul fibroblastelor cu un complex format din acid poliriboinozinic şi acid poliribocitidilic —poli(rI):poli(rC) — determină sinteza unor cantităţi apreciabile de interferon (Havell şi Vilcek, 1974). Cu toate că randamentul metodei creşte foarte mult dacă celulele

sînt tratate suplimentar cu actinomicină *D* și cicloheximidă, metoda este dezavantajată de faptul că fibroblastele nu pot fi cultivate în suspensie, ci doar atașate de particule de dextran substituit. În plus, metoda are și neajunsul că interferonul generat în acest sistem este mai puțin stabil decît cel sintetizat de leucocite.

Cea mai bună metodă de purificare a interferonului β pare să fie cea preconizată de Okamura și colab. (1980). Ea implică precipitarea cu sulfat de amoniu, trecerea prin filtre de sticlă cu pori calibrați, cromatografie pe carboximetil-celuloză, cromatografie pe coloană de Sepharose cuplată cu anticorpi și electroforeză preparativă în gel de poliacrilamidă, în prezență de dodecilsulfat. Activitatea specifică este, în acest caz, de 2×10^8 unități/mg proteină, iar randamentul de 31%.

Celulele transformate derivate din limfocite (linii celulare limfoblastoide), avînd avantajul de a putea fi cultivate nedefinit în suspensie, sînt și ele bune producătoare de interferon. Interferonul astfel produs are practic aceleași proprietăți fizico-chimice și biologice ca și interferonul obținut din leucocite (Havell și colab., 1978). Randamentul producerii interferonului pe această cale este considerat a fi destul de bun. Astfel, 10^6 celule din linia Namalwa sintetizează 0,01—0,05 megaunități de interferon. De menționat că interferonul obținut în acest mod este un amestec de IFN α și IFN β.

Recent, Fanconnier și Ruffout (1980) preconizează obținerea interferonului în culturi celulare de splină umană, infectate cu virus Sendai ca stimulator. Metoda este foarte simplă și randamentul ei pare a fi mult mai bun decît cel al metodei lui Cantell. Autorii estimează că o singură splină umană poate produce o cantitate de interferon egală cu aceea rezultată din 200 de prize de sînge. Inconvenientul major al metodei constă în dependența ei de accidentele rutiere, care „furnizează" de fapt splina umană necesară obținerii substratului celular.

IX.5.6. Purificarea interferonului

Înțelegerea la nivel molecular a numeroaselor fenomene controlate de către interferon nu poate fi realizată pînă cînd nu se va stabili structura primară și secundară a interferonului. Pînă în prezent s-au realizat unele progrese în acest domeniu, în principal datorită faptului că ele au fost condiționate de metodele de producere a interferonului, amintite anterior, care nu au fost capabile să ofere cantități suficiente de interferon cu gradul de puritate cerut de astfel de analize. Cantitățile de ordinul a cîtorva micrograme de interferon din fibroblaste umane (Knight, 1976), interferon de șoarece (Knight, 1975) sau din leucocite umane (Rubinstein și colab., 1979), puteau fi utilizate doar pentru a se obține informații structurale limitate.

Problema este pe cale de a fi definitiv rezolvată. Knight și colab. (1980) au găsit o metodă simplă capabilă să ofere interferon pur, necesar cercetărilor de mare finețe privind stabilirea structurii sale primare și secundare. Conform metodei preconizate, purificarea interferonului din fibroblastele umane se realizează în două etape. În prima etapă se utilizează cromatografia de afinitate (Blue Sepharose — sefaroza albastră — reține selectiv interferonul), iar în a doua etapă purificarea se desăvîrșește cu ajutorul electroforezei preparative în gel de poliacrilamidă. Metoda are mari șanse de a fi generalizată pentru purificarea și a altor tipuri de interferon. Este însă posibil ca ea să rămînă utilă mai ales pentru producerea de interferoni puri necesari studiilor de structură și să fie mai puțin utilă pentru producerea pe scară industrială a interferonului, întrucît cerințele actuale de interferon sînt extrem de mari și îi depășesc posibilitățile. Totuși, importanța metodei rămîne majoră, pentru că, de la descoperirea interferonului, purificarea și caracterizarea lui chimică au fost dezideratele principale ale cercetărilor din domeniu, iar celelalte metode nu au fost capabile să producă interferon în cantități suficiente.

Studiile de structură a interferonilor devenind accesibile, există acum posibilitatea de a compara între ei interferonii produși de diferite specii de animale, de a cunoaște mecanismul lor de acțiune, și — ceea ce este extrem de important — se deschide calea sintezei lor chimice.

IX.5.7. Structura primară a unor interferoni

Cunoașterea structurii primare a interferonilor prezintă importanță pentru cel puțin trei motive. În primul rînd, pentru procesul fundamental al cunoașterii și descifrării structurii unei substanțe biologic activă deosebit de importantă, avînd efect antiviral (și antitumoral) remarcabil. Această cunoaștere va permite stabilirea exactă a substratului său chimic și a mecanismului de acțiune.

În al doilea rînd, pentru posibilitatea pe care o oferă realizării sintezei sale chimice. Întrucît sinteza chimică a altor proteine biologic active (de exemplu, insulina) a avut mai mult un rol științific fundamental — fiind considerată, în afara unei performanțe remarcabile, ca o dovadă incontestabilă a structurii substanței respective — decît unul practic, dat fiind că prețul de cost al produsului sintetizat chimic este mult mai ridicat decît al produsului extras, este de așteptat ca și în cazul interferonului situația să fie aceeași, adică producția lui pe scară industrială să nu se facă pe bază de sinteză chimică.

În al treilea rînd, în sfîrșit, cunoașterea structurii primare a interferonului este importantă pentru posibilitatea pe care o oferă realizării sintezei genei care controlează producerea de interferon. Odată cunoscută secvența aminoacizilor din această macromoleculă, se poate realiza

proiectarea și sinteza polinucleotidului corespunzător genei interferonului. Trebuie subliniat că această sinteză este mult mai ușor de realizat decît sinteza chimică a interferonului, deoarece metodele existente astăzi pentru sinteza deoxiribonucleotidelor sînt mult mai eficiente decît cele pentru sinteza polipeptidelor.

Anul 1980 a fost deosebit de bogat în rezultate privind structura primară a interferonilor. Astfel, Mantei și colab. (1980) au determinat secvența totală a aminoacizilor interferonului uman α_1, Taniguchi și colab. (1980) a interferonului uman β, iar Streuli, Nagata și Weissmann (1980) — a interferonului α_2. În plus, Taira și colab. (1980) au determinat parțial structura interferonilor A și C de șoarece. O parte dintre aceste date sînt prezentate în tabelul 17, pentru comparația secvențelor, a asemănărilor și deosebirilor structurale dintre cei trei interferoni. Din tabel rezultă că între interferonii umani există mai degrabă deosebiri, decît identități structurale. O oarecare asemănare se găsește doar în regiunea moleculară cuprinsă între rezidiile 130 și 150. Nu este exclus însă ca părțile comune să conțină tocmai zonele active ale interferonilor. Este interesant de remarcat că, în ciuda deosebirilor de secvențe, cei trei interferoni au numărul de aminoacizi aproape identic: IFN α_1 și IFN β au 166 de aminoacizi, iar IFN α_2 are 165 de aminoacizi.

IX.5.8. Producerea interferonului prin tehnologia DNA recombinant

Teoretic, producerea interferonului prin tehnologia DNA recombinant se poate realiza prin trei variante. Prima variantă constă în izolarea genei pentru interferon cu ajutorul enzimelor de restricție și inserarea ei într-un vehicul care să o multiplice și să o exprime într-un sistem celular adecvat. Această variantă nu poate fi aplicată însă în practică, deoarece localizarea și izolarea genei pentru interferon nu este încă posibilă.

A doua variantă constă în sinteza chimică a genei interferonului, urmată de inserarea ei în vehicul, la fel ca și în cazul discutat mai sus. Întrucît în momentul de față există o metodă adecvată pentru obținere de interferon pur (Knight și colab., 1980), care este capabilă să furnizeze cantitățile necesare de interferon pentru analizele de secvență a aminoacizilor, se poate estima că în aproximativ un an structura primară a interferonilor și — implicit — structura genelor să fie cunoscută. Odată ce structura genei va fi descifrată, sinteza ei rămîne o problemă relativ ușor de realizat, ținînd cont de progresele remarcabile

Tabelul 1

Comparația secvențelor de aminoacizi* a trei interferoni umani diferiți

```
                                  10                  20                  30                  40
Hu IFNα1        C D L P E T H S L D N R R T L M L L A Q M - S R I S P S S C L M D R H D F G F P Q E
Hu IFNα2        C D L P Q T H S L G S R R T L M L L A Q M - R R I S L F S C L K D R H D F G F P Q E
Hu IFNβ     MSY N L L G F L Q R S S N F Q C Q K L L W Q L N G R - - L E Y C L K D R M N F D I P E E
  Identitate        L                           L L   Q       R           C L   D R     F     P   E

                              50                      60              70                    80
Hu IFNα1        E F D G N Q F Q K A P A I S V L H E L I Q Q I F N L F T T K D S S A A W D E D L L D
Hu IFNα2        E F - G N Q F Q K A E T I P V L H E M I Q Q I F N L F S T K D S S A A W D E T L L D
Hu IFNβ         I K Q L Q Q F Q K E D A A L T I Y E M L Q N I F A I F R Q D S S S T G W N E T I V E
  Identitate              Q F Q K                 E     Q   I F     F         S S     W   E

                              90              100                   110            120
Hu IFNα1        K F C T E L Y Q Q L N D L E A C V M Q E E R V G E T P L M N A D S I L A V K K Y F R
Hu IFNα2        K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C V I Q G V G V T E T P L M K E D S I L A V R K Y F Q
Hu IFN          N L L A N V Y H Q I N H L K T V L E E K L E K E D F T R G K L M S S L H L K R Y Y G
  Identitate                Y   Q   N   L                                       S   L         Y

                            130             140             150             160
Hu IFNα1        R I T L Y L T E K K Y S P C A W E V V R A E I M R S L S L S T N L Q E R L R R K E
Hu IFNα2        R I T L Y L K E K K Y S P C A W E V V R A E I M R S F S L S T N L Q E S L R S K E
Hu IFNβ         R I L H Y L K A K E Y S H C A W T I V R V E I L R N F Y F I N R L T G Y L R N
  Identitate    R I     Y L     K   Y S   C A W     V R   E I   R               L       L R
```

* Secvențele sînt scrise folosind notația cu o singură literă recomandată de IUPAC-IUB:

A — alanină; C — cisteină; D — acid aspartic; E — acid glutamic; F — fenilalanină; G — glicină; H — histidină; I — izoleucină; K — lizină; L — leucină; M — metionină; N — asparagină; P — prolină; Q — glutamină; R — arginină; S — serină; T — treonină; V — valină; W — triptofan; Y — tirozină.

obținute cu metoda triesterilor în sinteza altor gene (v. cazul genelor somatostatinei și insulinei).

A treia posibilitate de producere a interferonului prin tehnologia DNA recombinant este sinteza enzimatică a genei interferonului cu ajutorul reverstranscriptazei, folosind ca matriță mRNA specific pentru interferon. Această variantă a fost aplicată în practică, iar în anul 1980 o echipă de cercetători condusă de Weissmann a realizat prima sinteză de interferon într-o celulă bacteriană (Nagata și colab., 1980). Etapele principale ale lucrării sînt redate în continuare.

IX. 5.8.1. **Izolarea mRNA pentru interferon.** Leucocitele umane (10^{11} celule) au fost mai întîi tratate cu virus Sendai pentru inducerea sintezei de interferon. După cinci ore de la infecția cu virus celulele au fost lizate cu DDS 2%, iar lizatul s-a tratat la *p*H 9 cu pronază (200 μg/ml) timp de o oră la 20°C. Produsul rezultat a fost extras cu fenol timp de 30 minute. Pentru separarea fazelor s-a adăugat cloroform, iar faza apoasă a fost adusă la *p*H 5,5 cu tampon acetat. Din această fază acizii nucleici totali au fost separați prin precipitare cu alcool. Precipitatul s-a dizolvat în tampon cu *p*H 7,5 conținînd DDS 0,5 %, iar apoi a fost tratat de trei ori cu fenol. Urmele de fenol din faza apoasă s-au îndepărtat cu ajutorul eterului. În final, mRNA specific interferonului avînd o secvență terminală de poliA, motiv pentru care a fost denumit pe scurt poliA-mRNA, a fost izolat cu ajutorul cromatografiei de afinitate folosind oligo(dT)-celuloză ca substrat. Randamentul a fost de 1,6 mg de poliA-mRNA, iar 1 μg a dat naștere la 300 de unități de interferon.

Purificarea suplimentară a poliA-mRNA s-a făcut cu o coloană de Chelex-100 și centrifugare în gradient de sucroză 5—23%. Fracțiunile conținînd activitate mesageră pentru interferon au avut coeficientul de sedimentare de 12 S. Din acestea, poli-mRNA s-a recuperat prin trecere pe coloană de oligo(dT).

Poli-mRNA astfel purificat a avut o activitate specifică de aproximativ 10 ori mai mare (1 μg a dat naștere la 3 600 de unități de interferon).

IX. 5.8.2. **Sinteza genei interferonului (cDNA pentru poliA-mRNA).** Poli-mRNA pur (48 μg), obținut în urma cromatografiei de afinitate și prin ultracentrifugare în gradient de sucroză, a fost utilizat ca matriță pentru sinteza cDNA complementar, sinteza fiind realizată de reverstranscriptază. S-au obținut 10 μg de cDNA cu lungimea catenelor de 600—1 000 de nucleotide.

În faza următoare, cDNA a fost convertit de către DNA polimeraza I în cDNA bicatenar, iar apoi a fost tratat cu endonuclează *S*1 pentru a-i îndepărta zona monocatenară. Detaliile acestei sinteze sînt descrise într-o lucrare aparte (Hoeijmakers și colab., 1980) și nu vor fi prezentate, întrucît ele sînt foarte asemănătoare celor deja descrise la sinteza genei propreinsulinei.

De menţionat însă că s-au obţinut două preparate de cDNA, A şi B: preparatul A a conţinut o populaţie moleculară heterogenă (600—1 000 de perechi de baze), iar preparatul B a conţinut molecule care au sedimentat mai repede decît markerul de ^{32}P-DNA conţinînd 600 perechi de baze.

IX. 5.8.3. **Construirea DNA recombinant conţinînd gena interferonului.** Ca vehicul de clonare a fost aleasă plasmida *pBR322*, avînd masa moleculară de 2,6 $\times$ 10^6 daltoni. Pentru a introduce gena interferonului (cDNA sintetizat) sub formă de pasager, DNA plasmidial *pBR322* a fost deschis cu enzima de restricţie Pst I care are situsul specific în regiunea genei Ap^r. Pentru a introduce capete coezive la vehicul şi la pasager, DNA *pBR322* — convertit în formă liniară cu enzima de restricţie Pst I — a fost elongat cu rezidii dGMP, în timp ce cDNA a primit în acelaşi scop rezidii adiţionale de dCMP. Acest artificiu experimental a permis cuplarea corectă a pasagerului la vehicul, iar legarea lor covalentă s-a realizat cu ajutorul DNA-ligazei.

IX. 5.8.4. **Transformarea celulelor de E. coli χ 1776.** DNA recombinant construit din preparatele A şi B de cDNA inserate în DNA plasmidial *pBR322* a fost utilizat pentru transformarea celulelor de *E. coli* *χ 1776*, tulpină special pregătită pentru a asigura protecţia biologică în cercetările de inginerie genetică (Curtiss, 1977). Analizele au arătat că preparatul A a dat naştere la 3,3 $\times$ 10^4 transformanţi $Tc^r/\mu g$ DNA, în timp ce preparatul B a generat 4 $\times$ 10^4 transformanţi $Tc^r/\mu g$ DNA.

IX. 5.8.5. **Identificarea DNA recombinant în clonele bacteriene.** În scopul identificării DNA recombinant s-au făcut teste de hibridizare şi traducere. Coloniile (10^4) de *E. coli* transformate s-au inoculat individual în plăci speciale şi s-au păstrat în glicerol 20% la —20°C. Ulterior, clonele bacteriene s-au inoculat tot individual pe plăci de agar şi s-au incubat timp de 24 de ore, iar apoi s-au utilizat pentru obţinerea unor culturi din care s-a izolat DNA plasmidial.

cDNA hibrid s-a scindat cu Hin*d* III şi s-a amestecat cu poliA-mRNA specific interferonului. Amestecul s-a incubat 4 ore la 56°C în prezenţa formamidei, pentru a se produce hibridizare. După incubare soluţia s-a trecut peste filtre Millipor, iar RNA s-a recuperat de pe filtru prin încălzirea lui la 75°C timp de 5 minute în prezenţa EDTA şi DDS. Purificarea RNA s-a făcut prin cromatografie de afinitate pe coloană de oligo(dT), iar concentrarea s-a realizat prin precipitare cu etanol.

În final, RNA purificat şi concentrat a fost testat pe oocite de *Xenopus laevis* pentru capacitatea lui de a induce sinteza interferonului (capacitatea de traducere).

Testul de hibridizare şi traducere a permis identificarea unui set de colonii conţinînd DNA recombinant purtător al genei interferonului.

Ele au fost reclonate în tulpina de *E. coli HB101* și au fost denumite *Z-pBR328(Pst)/HcIF-2h* sau pe scurt *Hif-2h*.

IX. 5.8.6. **Unele proprietăți ale DNA recombinant Hif-2h.** S-a stabilit că gena inserată (pasagerul) din DNA recombinant *Hif-2h* are lungimea de 910 perechi de baze. Dintre acestea, 23 perechi de baze GC sînt 5'-terminale iar 15 sînt 3'-terminale.

Orientarea genei, determinată prin analiza secvenței nucleotidelor, a arătat că direcția ei de citire coincide cu aceea a genei β-lactamazei. *Hif-2h* dirijează în *E. coli* sinteza unui polipeptid care are activitate autentică de interferon, inducînd în celulele umane starea de rezistență la infecția virală. Polipeptidul este neutralizat de anticorpi antiinterferon de leucocite. Interferonul produs de *E. coli* stimulează, la fel ca și interferonul de leucocite, activitatea izoadenilatsintetazei.

Nu s-a determinat încă dacă interferonul produs de *Hif-2h* are aceeași activitate specifică ca și interferonul produs de leucocite. Se presupune însă că din punct de vedere structural interferonul produs în celula bacteriană este diferit de cel produs în celula umană, el nefiind glicozilat, întrucît celula bacteriană nu are capacitatea de a realiza acest proces. De asemenea, rămîne să se stabilească dacă potențialul clinic al interferonului de *E. coli* este același sau diferit față de cel al interferonului de leucocite umane.

S-a mai precizat că *Hif-2h* are proprietatea de a induce în *E. coli* sinteza a 1—2 molecule active de interferon per celulă.

IX.6. Construirea de DNA recombinant conținînd gena ovalbuminei

În ultimul timp consumul proteinelor de origine animală a crescut în mod considerabil pe glob, ca urmare a creșterii vertiginoase a populației. O șansă, alături de multe altele, de a salva în viitor omenirea de „foamea de proteine" o oferă chiar tehnologia DNA recombinant prin realizările sale spectaculoase. Una dintre acestea este sinteza unei „proteine asemănătoare ovalbuminei, de către bacteria *E. coli*, purtătoare a unui DNA recombinant", publicată în anul 1978 de un grup de cercetători francezi (Mercereau-Puijalon și colab., 1978). Cu toate că ovalbumina sintetizată de bacterie nu a fost total identică cu aceea extrasă din oul de găină, se speră ca ea să poată fi utilă ca aliment artificial pentru hrana unor animale. Perfecționarea ulterioară a tehnologiei va permite fără îndoială să se îmbunătățească calitatea ovalbuminei fabricată de către bacterie, astfel ca ea să aibă calitățile celei izolate din ou.

Sinteza ovalbuminei prin tehnologia DNA recombinant este prima sinteză a unei proteine mari, al cărei lanț polipeptidic este format din 386 aminoacizi — pentru comparație se precizează că somatostatina conține numai 14, iar insulina 51 aminoacizi. De subliniat că bacteria nou formată rămîne stabilă în timpul multiplicării și că nu are tendința de a elimina „grefa" de DNA străin introdusă în mod artificial, ceea ce deschide calea utilizării largi a bacteriilor pentru producerea de proteine de interes alimentar și industrial.

Ovalbumina este proteina majoră din albușul de ou. Cea din oul de găină — intens studiată — este formată dintr-un singur lanț polipeptidic de 386 aminoacizi, cu o singură punte disulfurică —S—S— și avînd o masă moleculară de aproximativ 46 000 daltoni. Acest lanț polipeptidic trece printr-o serie de modificări post-translaționale, printre care sînt de menționat ruperea primului rest de metionină, N-acetilarea, glicozilarea și fosforilarea unor resturi de aminoacizi, procese care duc la apariția de variante genetice ale ovalbuminei (Fothergill și Fothergill, 1970; Palmiter și colab., 1978; McReynolds și colab., 1977).

Ovalbumina este sintetizată de celulele oviductului, care o secretă pentru a fi incorporată în oul în curs de maturizare. Expresia ei este controlată la nivelul transcrierii de către estrogeni și progesteronă (Palmiter, 1975), la fel ca și pentru celelalte proteine din albușul de ou. Administrarea estradiolului, de exemplu, duce la o mică întîrziere în apariția mRNA pentru ovalbumină (McKnight, 1978). De aceea, este important de înțeles în termeni moleculari cum acționează reglarea hormonală, pentru a putea stimula creșterea cantității de ovalbumină în ou; dealtfel acesta a fost primul mobil care a determinat o analiză de detaliu a genei ovalbuminei. Cunoașterea genei și a mecanismului exprimării ei a permis în ultima vreme obținerea de ovalbumină prin tehnologia DNA recombinant (Mercereau-Puijalon și colab., 1978; Fraser și Bruce, 1978), ceea ce creează noi speranțe de producere de proteine de origine animală.

IX.6.1. Gena ovalbuminei

După cum au arătat pentru prima dată Breathnach și colab. (1977), structura genei naturale a ovalbuminei este deosebit de complexă, avînd numeroase discontinuități.

Discontinuitatea genei a rezultat din următoarea experiență: DNA celular de găină a fost hidrolizat cu ajutorul enzimelor de restricție, iar fragmentele rezultate au fost separate prin electroforeză în gel de agaroză și analizate în continuare prin hibridizare și autoradiografie. Pentru hibridizare s-a folosit un fragment de DNA de mărime cunoscută — 2 430 perechi de baze — (Humphries și colab., 1977) și care conține cea mai mare parte a DNA bicatenar complementar pentru mRNA

al ovalbuminei, clonat în plasmida *pCR1ov2.1*, cu excepția a 65 nucleotide din regiunea corespunzătoare capătului 5′ al mesagerului (Breatnach și colab., 1978). Fragmentul a fost obținut prin purificarea unui produs de digestie a plasmidei recombinante *pCR1ov2.1* cu enzima de restricție Hha I.

Pe baza datelor obținute s-a determinat mărimea fragmentelor de restricție a genei naturale a ovalbuminei și s-a construit harta genetică respectivă. Cu această ocazie s-a observat că harta genei celulare nu se suprapune cu harta cDNA pentru mRNA al ovalbuminei, clonat în plasmidă. Astfel, în timp ce în plasmida *pCR1ov2.1* nu s-a găsit nici un situs de acțiune pentru enzima Eco *R*I, DNA celular de găină restrictat cu aceeași enzimă dă naștere la patru fragmente polinucleotidice! Aceste fragmente, denumite **a, b, c** și **d,** au dimensiuni variate, de aproximativ 9,2, 2,4, 1,8 și, respectiv 1,3 kilobaze (Breatnach și colab., 1977).

Rezultatul comparației, paradoxal la prima vedere, s-a interpretat în cîteva moduri:

— s-ar putea ca în genom să existe mai multe copii ale genei pentru ovalbumină și/sau

— găinile cu care s-a lucrat erau heterozigote din punct de vedere al genei ovalbuminei.

Interpretarea s-a dovedit însă improprie, deoarece reluarea experiențelor cu găini homozigote a dus la obținerea de rezultate similare, iar datele privind structura genomului de găină au arătat că acesta conține o singură copie a genei pentru ovalbumină.

De asemenea, s-a constatat că numai fragmentul **a** ($\approx$ 9,2 kilobaze) hibridizează cu capătul 3′ al mRNA pentru ovalbumină, în timp ce capătul 5′ al mRNA hibridizează exclusiv cu **b** ($\approx$ 2,4 kilobaze). În ceea ce privește fragmentele de restricție **c** și **d,** s-a stabilit că ambele hibridizează cu o anumită regiune din mRNA, corespunzătoare zonei din cDNA localizată între centrii de clivare pentru enzimele Hae III și Pst I.

La o concluzie similară au ajuns în mod independent și alți autori cum ar fi Doel și colab. (1977), Weinstock și colab. (1978), Lai și colab. (1978). Asemănarea datelor obținute cu diferite linii de găini, în diferite părți ale lumii, arată că regiunea genei pentru ovalbumină în genomul respectiv este foarte bine conservată și consolidată.

Astfel a fost validată concluzia că gena naturală pentru ovalbumină este discontinuă *, adică formată prin înlănțuirea („înnodarea") unor

---

* În literatura de specialitate pentru genele de tipul celei a ovalbuminei, adică gene discontinui, se folosește termenul *spliced genes* (*to slice* = a înnoda, a lega).

zone (porţiuni) care se exprimă la transcriere *(exoni)* şi zone care nu se pot exprima *(introni)*.

IX. 6.1.1. **Organizarea fragmentelor genei celulare.** Datele obţinute, prezentate anterior nu au fost totuşi suficiente pentru a răspunde la întrebarea: care este organizarea reciprocă a fragmentelor **a**, **b**, **c**, **d** ale genei celulare?

De precizat că trebuie făcută o distincţie clară între „gena celulară" sau „naturală" a ovalbuminei — adică porţiunea din genomul de găină a cărei transcriere şi apoi traducere determină exprimarea ovalbuminei ca proteină, şi „gena structurală" pentru ovalbumină — adică DNA bicatenar complementar mRNA pentru ovalbumină, obţinută *in vitro*. Diferenţierea este justificată tocmai de deosebirile existente între ele şi care vor fi prezentate în continuare.

Iniţial s-a crezut că cele patru fragmente de genă celulară restrictată ar aparţine unor cromozomi diferiţi, dar analizele efectuate de Mandel şi colab. (1978) au adus noi precizări şi anume:

— toate fragmentele de DNA rezultate la digestia genei celulare cu Eco *R*I derivă dintr-un fragment de 18 kilobaze, produs în urma digestiei cu Bam *H*I;

— existenţa fragmentelor **c** şi **d** reflectă diferenţa existentă între doi cromozomi heterozigoţi;

— în genomul de găină fragmentele au o orientare spre dreapta, din punct de vedere al secvenţelor care codifică mRNA pentru ovalbumină, confirmînd caracterul „înnodat" al genei celulare a ovalbuminei şi relevîndu-i marea complexitate.

Hărţile de restricţie construite au fost completate cu date obţinute prin analiza la microscopul electronic a hibrizilor realizaţi între mRNA pentru ovalbumină şi cDNA clonat. De exemplu, cînd s-a lucrat cu fragmentul **b** s-a constatat o imagine neobişnuită şi anume existenţa a trei bucle de DNA nehibridizat, ceea ce a demonstrat prezenţa în acel fragment a trei secvenţe netranscrise (cel puţin trei) în DNA, secvenţe care lipsesc în mRNA (Garapin şi colab., 1978). În urma coroborării datelor de acest fel a rezultat că gena celulară este formată din şase introni (Gilbert, 1978), separaţi de şapte exoni (Mandel şi colab., 1978). Tehnicile folosite de autorii menţionaţi nu au permis însă detectarea secvenţelor mai mici de 50 nucleotide. Lucrînd cu tehnici cu sensibilitate crescută, Dugaiczyk şi colab. (1979) au pus în evidenţă o scurtă secvenţă, care codifică capătul 5'-terminal — lung de 45 nucleotide — al mRNA pentru ovalbumină. În efortul de a determina structura genei celulare s-au clonat numeroase alte fragmente de restricţie obţinute din DNA

de găină, ceea ce final a permis determinarea integrală a organizării genei naturale a ovalbuminei. Ea s-a dovedit a fi formată din 15 zone de lungimi variabile și anume: opt exoni separați de șapte secvențe de „DNA de intervenție" sau introni (fig. 85). (Dugaiczyk și colab., 1979).

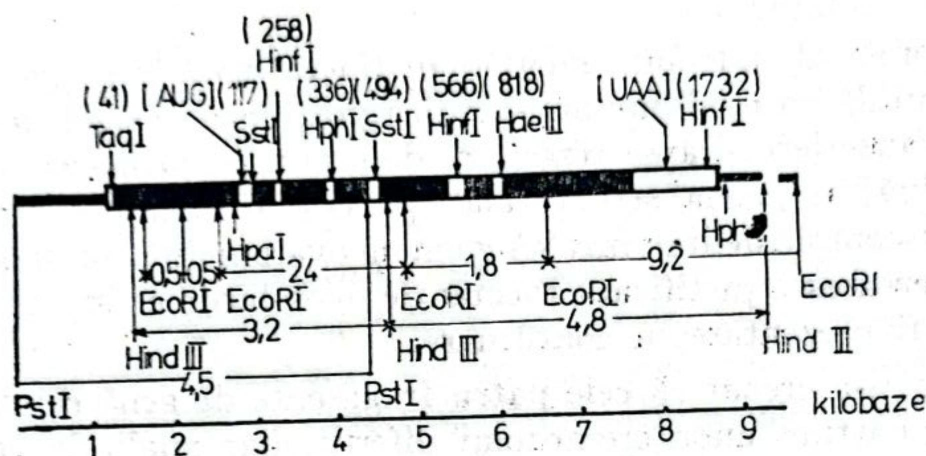


Fig. 85. Harta fizică a genei naturale integrale a ovalbuminei, cu indicarea unor situsuri de restricție mai importante, a codonilor de inițiere și de terminare și a regiunilor alternative exoni-introni (după *Dugaiczyk* și colab., 1979).

IX. 6.1.2. **Probleme legate de structura genei celulare a ovalbuminei.** Structura complexă deosebită a genei pentru ovalbumină, care ilustrează în mod pregnant existența unor diferențe de organizare între celulele eucariote și cele procariote, ridică o serie de probleme. Se pune întrebarea dacă gena este activă ca atare sau suferă modificări în cursul transcrierii.

Oare intronii sînt transcriși într-un pre-mRNA? Structura genei native pentru ovalbumină este compatibilă cu această ipoteză — toate secvențele care codifică mRNA pentru ovalbumină sînt în ordine de dreapta, similar orientate —, dar nu există încă dovezi la fel de ferme de sinteză a pre-mRNA ca în cazul altei gene complexe eucariote și anume a β-globinei (Tilghman și colab., 1978). Totuși s-au detectat molecule de RNA cu o lungime de cca 10 000 nucleotide și care conțin produși de transcriere atît pentru exoni, cît și pentru introni. S-a sugerat că apariția unor astfel de precursori ar implica formarea unor structuri cu perechi de baze între capetele opuse ale produșilor de transcriere a intronilor, pentru a permite aducerea în strînsă proximitate a capetelor produșilor de transcriere a doi exoni vecini, cu formarea unor „bucle" din produșii de transcriere a intronilor (Klessig, 1977).

Dar datele de secvență nu sînt compatibile cu un model atît de simplu. S-ar putea ca în mecanismele de excizie-excludere-legare să aibă un rol important alte tipuri de „împachetare", mai complicate, ale transcrișilor primari.

S-a remarcat că nici o „frontieră" exon-intron din gena ovalbuminei nu se poate defini în mod neechivoc, din cauza prezenței în aceste zone a unor nucleotide care se repetă (Breathnach și colab., 1978) (v. nucleo-

tidele încadrate, fig. 86). Se pare că datorită lor „înnodarea" genei se poate produce chiar în momentul sintezei ei, deși ar putea lua naștere și unele ambiguități. Breathnach și colab. (1978) au arătat că la capătul 5'-terminal al intronilor apare cu frecvență ridicată dinucleotidul GT, iar la capătul 3'-terminal se remarcă AG.

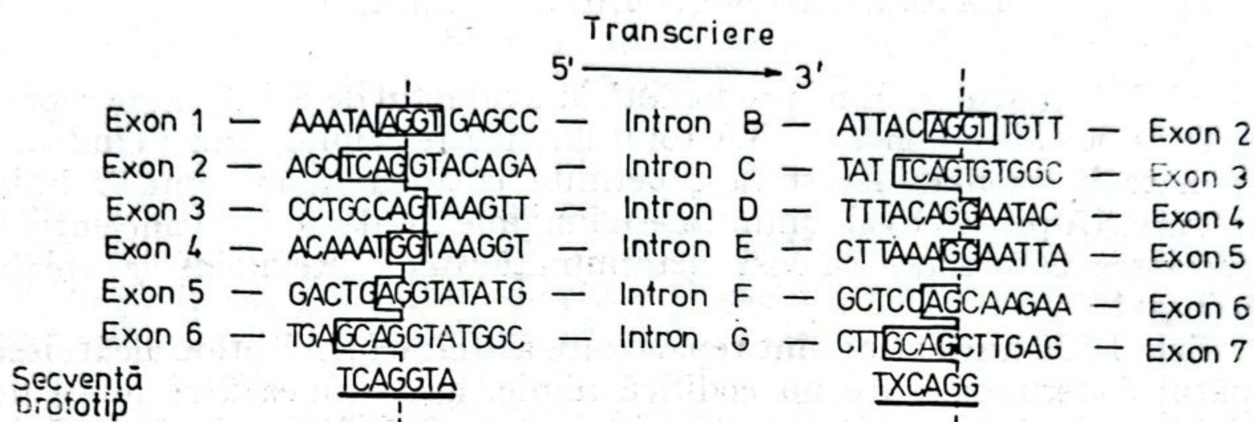


Fig. 86. Comparația secvențelor de DNA la frontierele exoni-introni ale genei naturale a ovalbuminei. Nucleotidele încadrate prezintă acele secvențe care se repetă și permit „înnodarea" în diferite moduri. Linia verticală întreruptă arată modul în care excizia și legarea („splicing"-ul) ar putea avea loc (după *Breathnach* și colab., 1978).

Comparînd datele de secvență pentru gena celulară a ovalbuminei cu alte secvențe din zona joncțiunilor intron-extron ale altor gene virale (genele timpurii și tîrzii ale SV40) sau gene de eucariote superioare (genele β-globinei de iepure și de șoarece, gena lanțului ușor al imunoglobulinelor λI și λII), autorii citați arată că ele pot deriva dintr-o aceeași secvență prototip și că punctele de joncțiune ale intronilor pot fi și în acest caz definite prin prezența dinucleotidelor 5'-GT și 3'-AG. Aceste asemănări sugerează că procesul transcrierii primare a tuturor acestor gene ar avea loc printr-un mecanism asemănător.

O altă problemă ridicată de structura atît de complexă a genei naturale a ovalbuminei a fost cea a repetabilității în genom a secvențelor de intervenție. Cercetările lui Garapin și colab. (1978) efectuate în acest scop nu au reușit să evidențieze prezența unor secvențe repetitive de acest tip.

IX. 6.1.3. **Rolul intronilor.** S-a pus întrebarea de ce gena unui organism eucariot superior conține introni? Descoperirea acestor structuri complexe a dat naștere la numeroase speculații (Gilbert, 1978; Blake, 1978). În acest context, s-a emis ipoteza că genele discontinui ar putea să fie replica eucariotă a operonului bacterian. Totodată s-a remarcat că același pre-mRNA poate fi tăiat în diverse moduri, formînd diferiți mRNA și ca atare să genereze diferite polipeptide. Este interesant de observat că majoritatea genelor care codifică proteinele predo-

minante din ou — conalbumină, ovomucoid, lizozim — au, la fel ca și ovalbumina, o structură discontinuă.

IX.6.2. mRNA pentru ovalbumină

mRNA al ovalbuminei predomină în oviductul de găină, unde reprezintă cca 50% din poliA-mRNA total din aceste celule (atunci cînd sînt stimulate hormonal). Acest fapt permite izolarea sa în formă relativ pură. mRNA pentru ovalbumină are o lungime totală de 1859 nucleotide, a căror secvență totală a fost determinată de McReynolds și colab. (1977 și 1978).

Cele 1 859 nucleotide sînt repartizate astfel: 64 nucleotide alcătuiesc capătul 5'-terminal care nu codifică nimic, apoi urmează regiunea de codificare de 1158 nucleotide lungime și capătul 3'-terminal, zonă în care se află alte 627 nucleotide care nu codifică nimic. Zona tradusă este continuă, dar în lumina celor expuse despre genele discontinui, „înnodate", nu se știe exact dacă provine dintr-un pre-mRNA mai lung, prin excizia segmentelor complementare corespunzătoare intronilor.

La fel ca și unii mRNA virali (Sambrook, 1977; Chambon, 1978) mRNA pentru ovalbumină prezintă o așa-numită secvență conducătoare de dirijare * *(leader)* lungă de 45 nucleotide.

IX.6.3. Etapele construirii DNA recombinant pentru ovalbumină

Cu toate că tehnologia DNA recombinant permite introducerea și clonarea în *E. coli* a genelor străine de diverse origini, exprimarea acestora în mediul bacterian nu este, pentru moment, perfect documentată teoretic. Unele gene, izolate din celule eucariote inferioare (drojdii, *Neurospora crassa*, *Drosophila*), au fost exprimate de către *E. coli* în mod spontan (Struhl și colab., 1977; Rambach și Hogness, 1977; Clarke și Carbon, 1978).

În ceea ce privește exprimarea în bacterii a genelor celulelor eucariote superioare, lucrurile sînt ceva mai complicate, dar transcrierea mesajului eucariot a putut fi forțată în mod eficient prin integrarea secvențelor de gene în bacterie. De exemplu, în acest mod s-a construit o tulpină de *E. coli* capabilă să producă un hormon polipeptidic cu moleculă mică — somatostatina (Itakura și colab., 1977) — sub forma unei proteine-hibrid. Întrucît somatostatina nu conține metionină (care o leagă

---

* Termenul de „conducător" *(leader)* corespunde unei secvențe de DNA separată fizic de secvențele care codifică proteina.

de o proteină bacteriană), labilă în anumite condiţii, hormonul a putut fi eliberat prin tratament cu BrCN. Dar, cele mai multe polipeptide conţin metionină, astfel încît metoda prezentată are o valabilitate restrînsă.

Tehnologia DNA recombinant s-a dovedit a avea şi alte aplicaţii — în afara sintezei unor polipeptide mici, de tipul somatostatinei, codificate de gene sintetizate chimic— cum ar fi sinteza unor molecule proteice mari — de tipul ovalbuminei — de interes fundamental sau aplicativ. Descoperirea că cel puţin unele gene de eucariote sînt discontinui (Breathnach şi colab., 1977; Brack şi Tonegawa, 1977 etc.) a făcut la început puţin probabilă posibilitatea ca aceste gene, izolate ca atare din genom, să se poată exprima în *E. coli*. În acest caz, strategia adoptată pentru exprimarea în *E. coli* a genelor respective — de exemplu pentru ovalbumină, realizată pentru prima oară de către Mercereau-Puijalon şi colab. (1978) şi, aproape simultan, de către Fraser şi Bruce (1978) — s-a bazat pe următoarea secvenţă de evenimente:

— extracţia mRNA specific;

— sinteza enzimatică a cDNA, deci obţinerea unei gene sintetice (eventual, purificată prin clonare);

— legarea secvenţei cDNA bicatenar construit la o genă bacteriană, astfel încît secvenţa eucariotă să fie citită în mod corespunzător;

— clonarea în *E. coli*.

Pentru obţinerea ovalbuminei prin tehnologia DNA recombinant s-a lucrat în condiţii de protecţie fizică *P2* şi folosind gazde de tip *EK1*, în modul pe care-l vom prezenta în continuare.

IX. 6.3.1. **Clonarea copiilor de DNA a mRNA al ovalbuminei.** Întrucît mRNA al ovalbuminei reprezintă aproximativ 50% din mRNA extras din celulele oviductului de găină stimulat hormonal cu estrogeni, el poate fi purificat cu uşurinţă. mRNA extras a fost copiat enzimatic la DNA complementar (cu reverstranscriptază); gena structurală sintetică obţinută pentru ovalbumină a fost apoi clonată în *E. coli*. Clonarea s-a dovedit deosebit de necesară, deoarece:

— în acest fel purificarea mesagerului pentru ovalbumină nu trebuie să fie foarte înaintată şi deci nu se reia de prea multe ori;

— odată clonată secvenţa ovalbuminei devine liberă de eventualii contaminanţi existenţi în preparatele de mRNA;

— plasmida recombinantă poate fi obţinută în cantităţi mari;

— posibilitatea de obţinere a secvenţelor pure de ovalbumină, sub forma cDNA bicatenar, permite o precisă analiză de restricţie, precum şi determinarea secvenţei DNA.

Primul transcript, aproape integral, al mRNA de ovalbumină, din care lipsesc primele 14 nucleotide de la capătul 5' al mRNA (mRNA al ovalbuminei are 1859 nucleotide) a fost obţinut de Humphries şi colab., (1977) sub forma plasmidei *pCR1Ov2.1*. Independent, McReynolds şi

colab. (1978) au obţinut un alt transcript esenţial al mRNA al ovalbuminei din care lipsesc numai primele 12 nucleotide de la capătul 5′ terminal, denumit plasmida *pOV230*.

Din aceste plasmide recombinante a fost recuperată gena ovalbuminei, prin hidroliza cu endonucleaze de restricţie.

IX. 6.3.2. **Construirea plasmidei lac-ova pUC1001.** Gena structurală a ovalbuminei, clonată şi purificată în modul anterior arătat, a fost inserată într-o nouă plasmidă, în vederea construirii DNA recombinant pentru ovalbumină, capabil să se exprime într-o celulă bacteriană.

Cele două colective de cercetători care au realizat pentru prima dată această performanţă au folosit pentru integrare două vehicule diferite: plasmida *pOMP1*, cu o lungime de 7,1 kilobaze, derivată de la *pBR322* (Mercereau-Puijalon şi colab., 1978) şi plasmida *pOP203*, derivată de la *pMB9* (Fraser şi Bruce, 1978).

În continuare se redă schema de lucru folosită de către Fraser şi Bruce (1978) (fig. 87), pentru construirea plasmidei recombinante pentru ovalbumină *pUC1001*.

Plasmida *pOP203* a fost scindată cu Eco *R*I, apoi molecula liniară s-a tratat cu fosfatază alcalină, pentru îndepărtarea grupărilor 5′-fosfat,

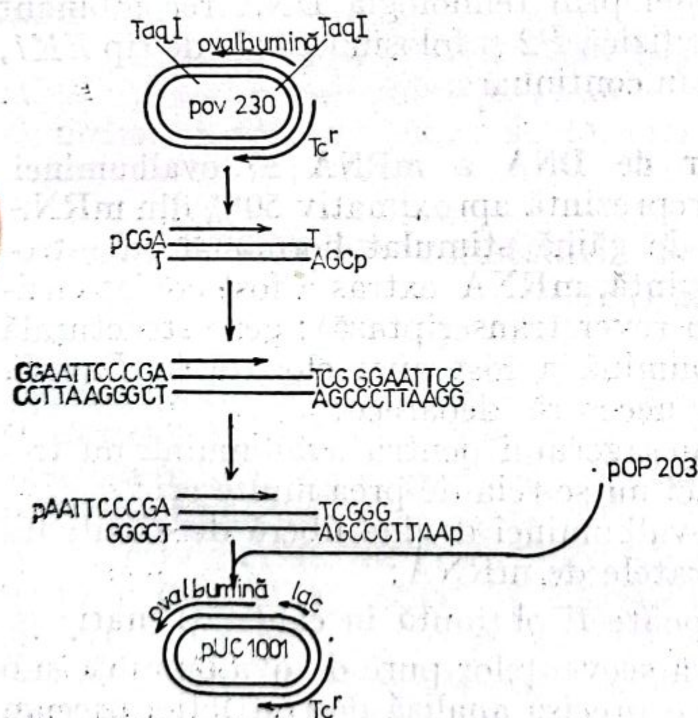


Fig. 87. Etapele parcurse pentru legarea elementelor operonului *lac* la gena ovalbuminei, cu obţinerea plasmidei *pUC1001* (după *Fraser* şi *Bruce*, 1978).

în scopul evitării recircularizării vehiculului în cursul legării. În paralel, s-a prelucrat plasmida *pOV230*, care are în constituţia sa gena structurală pentru ovalbumină; aceasta conţine un singur situs pentru endonucleaza de restricţie Taq I, situat la 25 nucleotide de capătul 5′ al iniţiatorului AUG pentru ovalbumină. Fuzionarea în acest loc a regiunilor de control bacterian din *pOP203* a permis exprimarea întregii gene

pentru ovalbumină. În afara genei pentru ovalbumină, la aproximativ 250 nucleotide distanță, *pOV230* mai are un situs specific pentru Taq I.

Secvențele regiunii de control *lac* în *pOP203* și ale genei ovalbuminei inserate în *pOV230* se cunosc, ceea ce a ajutat la legarea DNA *lac* și a cDNA bicatenar pentru ovalbumină de așa manieră, încît la traducere să se mențină orientarea normală, considerînd că sinteza proteică începe de la codonul de inițiere pentru β-galactozidază. Dintre căile posibile care pot asigura legarea în fază a vehiculului și a pasagerului, Fraser și Bruce (1978) au ales următoarea: secvențele monocatenare de la capetele coezive ale tăieturii *pOV230* cu TaqI au fost „umplute" (complementarizate) cu ajutorul DNA polimerazei *T4* și apoi legate cu linkeri (octameri sintetici) pentru a forma centrii pentru Eco *RI*; în continuare s-a făcut hidroliza cu Eco *RI*, cu apariția de capete coezive, cu extensii 5'. Pentru purificarea fragmentului de interes s-a procedat la o gel filtrare.

După eluția de pe gel, fragmentul de DNA *pOV230* a fost legat, în prezența DNA-ligazei *T4*, cu vehiculul plasmidei *pOP203*, tratat cu fosfatază. În acest mod s-a obținut plasmida recombinantă *pUC1001*, care conține inserată gena structurală a ovalbuminei.

DNA legat s-a folosit la transformarea *E. coli HB101*, selectîndu-se colonii Tc^r. Transformanții au fost testați *in situ* pentru producerea ovalbuminei, folosindu-se metode radioimunologice. Coloniile s-au lizat cu lizozim și sarcozil după creșterea pe agar cu ser antiovalbumină, izopropiltiogalactozidază și tetraciclină. În jurul unor colonii s-au format inele de precipitare, ușor de decelat, ceea ce a arătat că ele produc cantități apreciabile de ovalbumină.

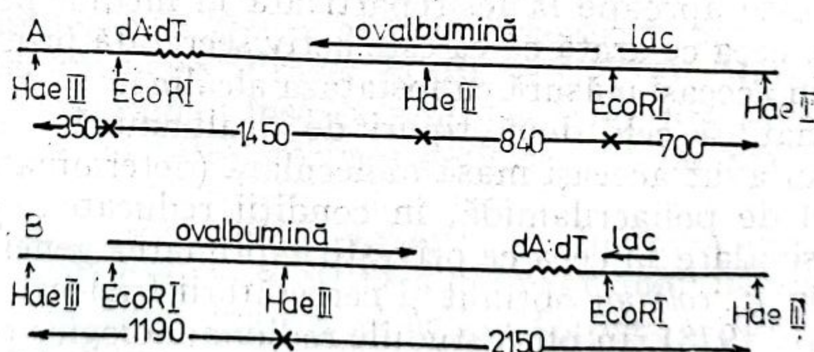


Fig. 88. Hărțile de digestie cu unele endonucleaze de restricție a plasmidelor conținînd gena ovalbuminei, cu prezentarea celor două orientări posibile ale acestei gene față de elementele controlului *lac* (după *Fraser* și *Bruce*, 1978).

Pentru o verificare suplimentară s-a procedat la o digestie cu enzime de restricție (Hae III, Eco *RI*) a DNA *pUC1001* și analizarea prin electroforeză pe gel de agaroză a fragmentelor rezultate. Legarea pasagerului de vehicul putea duce la două moduri de legare (fig. 88):

— forma A, care prin transcriere și traducere dă naștere la ovalbumină;

— forma B, care nu duce la exprimarea ovalbuminei.
De aici concluzia că legarea s-a făcut în forma A.

IX. 6.3.3. **Exprimarea în E. coli a genei structurale a ovalbuminei.** Lucrîndu-se în imunodifuzie cu ovalbumină standard, s-a stabilit că aproximativ 1,35—1,6% din proteina celulară din celulele de *E. coli* clonate este reprezentată de către ovalbumină, după cum a reieşit şi din colorarea cu Coomassie Brilliant blue a electroforezelor pe gel de poliacrilamidă cu DDS 0,1% în condiţii reducătoare, a proteinelor celulare din bacterii în care s-a exprimat gena structurală a ovalbuminei.

În absenţa izopropilgalactozidului, randamentul de ovalbumină a scăzut cu aproximativ 50%, ceea ce a dovedit că într-adevăr sinteza acestei proteine eucariote s-a aflat sub control *lac*.

Pentru a determina dacă bacteria secretă ovalbumină în spaţiul periplasmatic, *E. coli* cu plasmida *pUC1001* au fost crescute pe medii cu izopropiltiogalactozid şi cu tetraciclină. Celulele au fost aduse la forma de protoplaşti prin tratare cu lizozim şi EDTA şi apoi s-au centrifugat. Supernatantul de la ultracentrifugare a conţinut proteinele periplasmatice, iar sedimentul — protoplaşti. Ca marker pentru proteinele nesecretate s-a folosit β-galactozidază, iar pentru proteinele periplasmatice — fosfataza alcalină. Mai mult de 96% din activitatea β-galactozidazei s-a regăsit în protoplaşti, restul — sub 4% — impurificînd periplasma. Mai puţin de 75% din activitatea fosfatazei alcaline s-a evidenţiat în periplasmă, ceea ce a sugerat că unele proteine periplasmatice nu sînt eliberate în supernatant. S-a stabilit prin această metodă că ovalbumina este aproape la fel repartizată în mediul periplasmatic şi în protoplaşti, ceea ce arată că ea este activ secretată prin membrana *E. coli*, deşi nu în aceeaşi măsură ca fosfataza alcalină.

De menţionat că cele două tipuri de ovalbumină — secretată şi nesecretată — au avut aceeaşi masă moleculară (determinată prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă, în condiţii reducătoare).

Rezultate similare în ceea ce priveşte exprimarea genei structurale a ovalbuminei în *E. coli* au obţinut şi cercetătorii francezi (Mercereau-Puijalon şi colab., 1978). În plus, studiile radioimunologice pe care le-au întreprins au arătat că ovalbumina „fabricată" de către bacterie este lipsită de unul (sau mai multe) din centrii antigenici. Întrucît masa moleculară a „ovalbuminei bacteriene" este asemănătoare cu cea a ovalbuminei native din ou s-a dat credit următoarei explicaţii: afinitatea centrilor antigenici ai „ovalbuminei bacteriene" pentru anticorpii respectivi este mai mică decît cea a ovalbuminei native originale, deoarece în oviduct albumina suferă o serie de transformări posttranslaţionale, care ar putea avea rolul lor în structura determinanţilor antigenici. Astfel de modificări nu se produc în mod sigur în *E. coli*. Cantitativizarea ovalbuminei din bacterie a arătat un randament de aproximativ 15 ng de produs pentru $2,5 \times 10^6$ celule, ceea ce înseamnă aproximativ 90 000 molecule proteice.

Bacteriile *E. coli* în care s-au introdus plasmidele recombinante *pOM2* (Mercereau-Puijalon și colab., 1978) și *pUC1001* (Fraser și Bruce, 1978) s-au dovedit a fi stabile, fără tendința de a-și pierde plasmidele respective. Sinteza ovalbuminei în aceste bacterii, inițiată de promotorul *lac* al plasmidelor *pOM2* și *pUC1001*, a început cu poziția 39—AUG— a β-galactozidazei, ceea ce a făcut ca proteina eucariotă să aibă la un capăt o secvență suplimentară de 18 aminoacizi; această „coadă" dispare însă în cursul secreției, sau prin liză cu proteaze celulare.

Nivelul de 1,5% ovalbumină din totalul de proteine bacteriene este inferior nivelului care poate fi atins teoretic în acest sistem. S-a stabilit că plasmida recombinantă are o multiplicitate de 20—30 copii per celulă (Fraser și Bruce, 1978). Se știa că β-galactozidaza, cu o singură copie de genă per celulă de *E. coli* reprezintă aproximativ 2% din proteinele celulare (Miller, 1972), așa că ovalbumina ar trebui să ajungă — în aceste condiții — la aproximativ 19% din proteinele celulare, iar ea abia atinge un randament sub 10% din cel teoretic.

Unele din explicațiile probabile ar fi cele de mai jos:

— codonii din mRNA al ovalbuminei ar putea avea frecvență simțitor diferită de cea existentă în mesagerii din *E. coli*; astfel, unii codoni (AUC, GUG, CCA, GAC, GAA, GCA) sînt mai des folosiți în gena ovalbuminei decît într-unii bacteriofagi de *E. coli* cu secvență cunoscută, cum ar fi MS2 sau ΦX 174 (Sanger și colab., 1977; Efstratiadis și colab., 1977);

— deși nu există încă date suficiente care să permită generalizarea, s-ar putea ca unii din tRNA izoacceptori, necesari pentru traducerea genei ovalbuminei în *E. coli* să aibă o concentrație mai redusă, limitînd sinteza acestei proteine (Fraser și Bruce, 1978). Mercereau-Puijalon și colab. (1978) consideră însă că posibila deficiență a *E. coli* în tRNA corespunzători nu ar interfera prea mult cu exprimarea secvenței genei ovalbuminei;

— în cursul exprimării genei pentru ovalbumină ar putea interveni unele procese de degradare proteică a polipeptidului nascent pe polizomi și/sau a polipeptidului matur, eliberat. Datele experimentale înclină către proteoliza polipeptidului nascent.

Prezența la bacterii a unei membrane rigide multistratificate ridică probleme speciale de secreție a proteinelor în mediu: nu se știe dacă aceste proteine străbat straturile respective în mod succesiv sau dacă există regiuni specializate ale membranei citoplasmatice expuse direct exteriorului, prin care proteinele ies în mediul extern.

În plus, segregarea diferitelor proteine între membrana internă și cea externă a bacteriilor Gram-negative prezintă o problemă de morfogeneză a membranei, analoagă celei din celulele eucariote (Davies și Tai, 1980).

Mecanismele de secreție din celulele bacteriene au recunoscut în mod evident — semnalele celulei eucariote (în cazul prezentat, de găină),

cîtă vreme *E. coli* conținînd inclusă gena ovalbuminei pot secreta această proteină (Mercereau-Puijalon și colab., 1978; Fraser și Bruce, 1978).

Biosinteza ovalbuminei în *E. coli*, prin tehnologia DNA recombinant, este primul exemplu de sinteză în celulele bacteriene a unui lanț polipeptidic lung de la eucariote superioare și, de asemenea, primul exemplu de lanț polipeptidic lung sintetizat cu un randament promițător de la un cDNA bicatenar clonat, obținut pe matrița mRNA.

În întregul lor, aceste experimente au demonstrat posibilitatea de manipulare a bacteriilor în scopuri diverse. Datorită conținutului său bine echilibrat în aminoacizi, ovalbumina este utilizată deseori ca standard de valoare nutritivă și se poate imagina că proteina asemănătoare „fabricată" de bacterii, poate servi în scopuri alimentare.

IX.7. DNA recombinant obținut din operatorul lac și plasmida pMB9

IX.7.1. Sinteza chimică a operatorului lac

Cu ajutorul metodei fosfotriesterilor descrisă de grupul lui Itakura s-au sintetizat patru oligonucleotide, dintre care două au conținut 11 nucleotide (I și IV), iar celelalte două 15 nucleotide (II și III) care

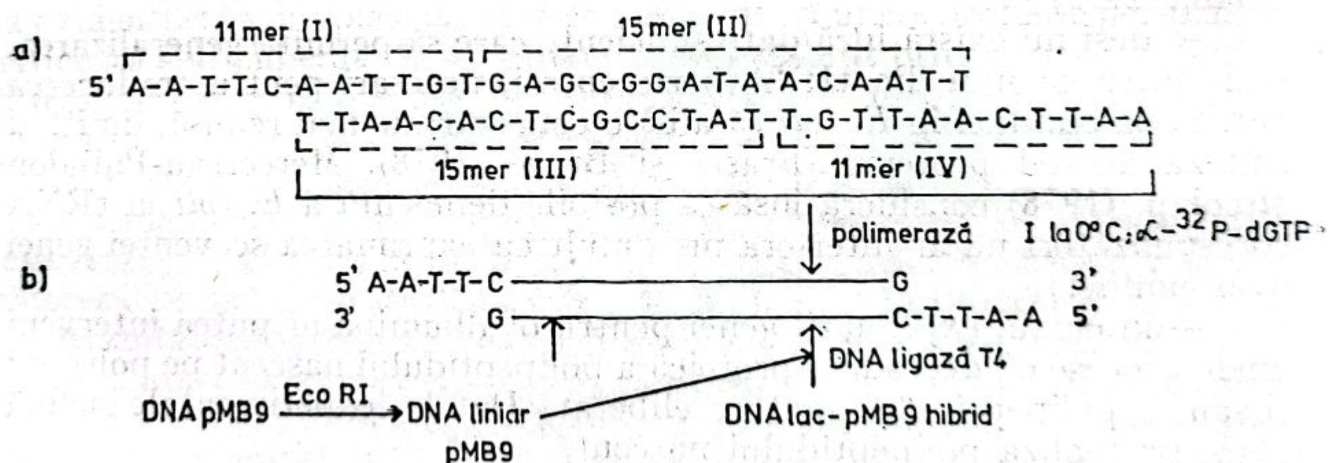


Fig. 89. Schema modului în care a fost construit DNA recombinant purtător al operonului *lac*.

au fost legate între ele cu DNA-ligază *T4* în așa fel încît să constituie împreună atît secvența nucleotidelor operatorului *lac*, cît și capetele monocatenare coezive similare cu cele generate de enzima de restricție Eco *R*I (fig. 89).

IX. 7.1.1. **Pregătirea operatorului pentru inserție în plasmidă.** Operatorului sintetizat conform schemei de mai sus îi mai trebuie o nucleo-

tidă (G) cu capătul 3' pentru a avea situsul corect al enzimei Eco *R*I. Pentru a realiza adiția acestei nucleotide, operatorul a fost incubat la 0°C în prezența polimerazei I și a ^{32}P-dGTP (fig. 66).

IX. 7.1.2. **Pregătirea plasmidei pMB9.** Din forma sa *CCI* plasmida a fost convertit în formă liniară de către enzima Eco *R*I. În urma acestui tratament, la plasmidă au apărut și capete coezive de tip Eco *R*I, capabile de a se lega de capetele operatorului.

Operatorul *lac*, avînd secvența suplimentară monocatenară cu capetele 5'-AATT, a fost amestecat cu forma liniară a plasmidei *pMB9* în proporția molară de 1pM : 3pM. Formarea moleculei hibride a fost realizată prin incubarea amestecului timp de 20 ore la 12,5°C în prezența DNA ligazei *T4*. DNA recombinant rezultat a fost folosit pentru a transforma celule competente de *E. coli*. Pentru a facilita pătrunderea DNA recombinant în celule, amestecul de celule împreună cu DNA au fost întîi incubate la 0°C timp de 30 min, după care temperatura s-a ridicat la 42°C timp de 2 min. După acest tratament celulele au fost aduse la temperatura lor normală de creștere. Clonele rezultate au fost selecționate și analizate pentru a determina multiplicarea și exprimarea DNA recombinant.

Datele experimentale obținute au dovedit că: a) DNA recombinant s-a multiplicat în unele celule și b) operatorul *lac* incorporat în DNA recombinant s-a exprimat, fapt pus în evidență prin producerea de β-galactozidază.

DNA recombinant conținînd gena hormonului paratiroidian bovin Kronenberg și colab. (1979) au clonat în *E. coli* gena hormonului paratiroidian bovin. DNA recombinant s-a construit din plasmida *pBR322* și cDNA sintetizat cu ajutorul mRNA specific hormonului preproparatiroidian. Gena a fost inserată la locul de scindare a plasmidei cu enzima de restricție Pst I. Realizarea este deosebit de importantă întrucît acest hormon are un rol esențial în reglarea concentrației de Ca^{2+} la nivelul sîngelui care, la rîndul ei, dirijează secreția de hormon paratiroidian.

DNA recombinant conținînd gena δ-cristalinului. δ cristalinul de pui este prima proteină care apare în lentila ochilor embrionilor de pui. Recombinantul denumit *pδCr-2* s-a construit din plasmida *pBR322* și gena δ cristalinului sintetizată enzimatic pe matrița mRNA izolat din celulele lentilei ochilor embrionilor de pui, în vîrstă de 15 zile (Bhot și Piotigorsky, 1979).

DNA recombinant conținînd gena corticotropinei și a β-lipotropinei. S-a pornit de la mRNA care codifică polipeptida precursoare corticotropinei (ACTH) și β-lipotropinei (LPH) pentru a obține cDNA corespunzător genei. Aceasta a fost apoi inserată într-o plasmidă și clonată în bacterii (Roberts și colab., 1979).

IX.8. Obținerea DNA recombinant prin experiment de tip shotgun

Acest tip de experiment este considerat mult mai periculos decît cele efectuate conform tehnicilor arătate cu materiale bine purificate și caracterizate, deoarece în acest caz DNA recombinant de interes

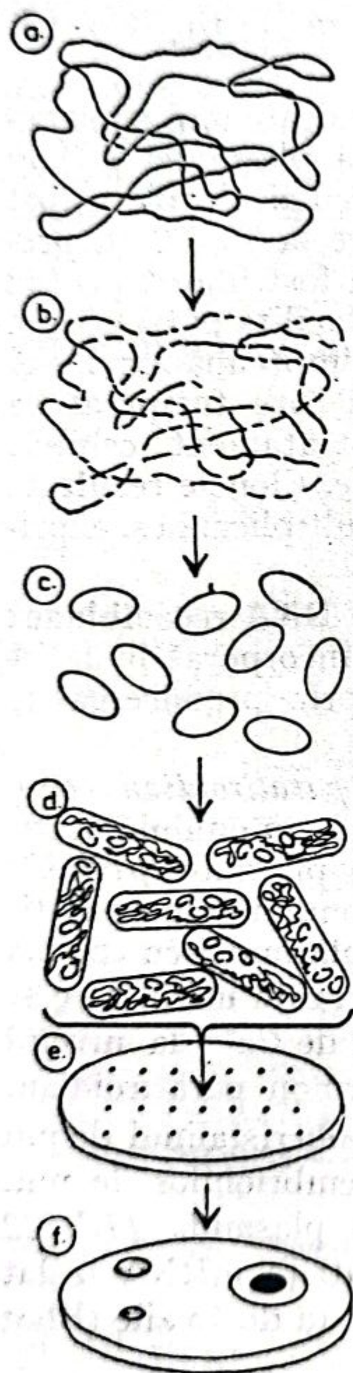


Fig. 90. Schema unui experiment de tip „shotgun" (după *Grobstein*, 1977).

se obține la întîmplare, iar alături de el mai apare un evantai întreg de alți DNA recombinanți, dintre care unii pot genera organisme noi patogene.

Dar să redăm principiul pe care se bazează experimentul. Se extrage DNA cromozomal dintr-un organism al cărui DNA conține gena de interes pe care dorim să o multiplicăm și să o exprimăm cu ajutorul unui vehicul adecvat. DNA este supus acțiunii uneia sau mai multor enzime de restricție care îl fragmentează. Paralel se pregătește un vehicul adecvat, înțelegînd prin aceasta izolarea și tratarea lui cu una sau mai multe enzime de restricție pentru a-i crea capete coezive. De precizat că atît DNA cromozomal, cît și vehiculul se fragmentează cu aceleași enzime de restricție, pentru a rezulta capete coezive identice.

În continuare, se amestecă cele două componente (fragmentele de DNA cromozomal și vehiculul pregătit), ceea ce permite cuplarea *la întîmplare* a vehiculelor cu diferite fragmente de DNA. În acest moment se produc o serie întreagă de DNA recombinanți diferiți, amestecul lor fiind folosit apoi la transformarea celulară. Celulele-gazdă sînt cultivate pe un mediu adecvat, iar fiecare celulă receptoare de DNA recombinant se dezvoltă sub forma unei colonii. Dată fiind heterogenitatea materialului folosit pentru transformarea celulară, el generează diverse colonii, corespunzătoare diferiților DNA recombinanți incluși. Se formează o adevărată „bibliotecă de gene", cum o numește Grobstein (1977), constituită din celule care conțin DNA recombinanți formați din același tip de vehicul, dar cu fragmente diferite de DNA cromozomal.

Clonele obținute sînt apoi analizate pentru a le identifica pe acelea care conțin DNA recombinanți de interes. Metoda cea mai convenabilă este cea bazată pe hibridizarea specifică a celulelor direct pe membrane de nitroceluloză.

Un experiment de tip *shotgun* este prezentat schematic în fig. 90.

Bibliografie

1. Berg, K. Heron, I. *Scand: J., Immunol.*, **11**, 489 (1980).
2. Bhat, S.P., Piatigorsky, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 3299 (1979).
3. Blacke, C.C.F., *Nature*, **273**, 267 (1978).
4. Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crossa, J.H.,Falkow, S., *Gene*, **2**, 95 (1977).
5. Black, C., Tonegawa, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **74**, 5652 (1977).
6. Breathnach, R., Benoist, C., O'Hare, K., Gannon, F., Chambon, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **75**, 2458 (1978).
7. Breathnach, R., Mandel, J.L., Chambon, P., *Nature*, **270**, 314 (1977).
8. Burrell, C.J., Mackay, P., Greenway, P.J., Hoffschneider, P.H., Murray, K., *Nature*, **279**, 43 (1979).
9. Cantell, K., Hirvonen, S., Morgensen, K.E., Pyhala, L., în *„In vitro Monography"*, **3**, 35 (1973).
10. Cantell, K., Strander, H., *Symp. Univ. Uppsalla*, p. 73 (1977).
11. Chambon, P., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **42**, 1211 (1978).
12. Chan, S.J., Keim, P., Steiner, D.F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **73**, 1964 (1976).
13. Charnay, P., Pourcel, C., Fritsch, A., Louise, A., iollais, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 2222 (1979).

14. Clarke, L., Carbon, J., *J. Mol. Biol.* **120**, 517 (1968).
15. Crea, R., Kraszewsky, A., Hirose, T., Itakura, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **75**, 5765 (1978).
16. Curtiss, R. III, *Miami Winter Symp.*, **13**, 44 (1977).
17. Davies, B.D., Tai, P.C., *Nature*, **283**, 433 (1980).
18. Dianzani, F., Baron, S., *Tex. Rep. Biol. Med.*, **35**, 297 (1977).
19. Dickson, R.C., Abelson, J., Barnes, W.M., Reznikoff, W.S., *Science*, **187**, 27 (1975).
20. Doell, M.T., Houghton, M., Cook, E.A., Carey, N.H., *Nucl. Acids Res.*, **4**, 3701 (1977).
21. Dugaiczyk, A., Wood, S.L.C., Colbert, D.A., Lai, E.C., Mace, M.L., O'Malley, B.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 2253 (1979).
22. Efstratiadis, A., Kafatos, F.C, Maniatis, T., *Cell*, **10**, 571 (1977).
23. Emtage, J.S., Tacon, W.C.A., Catlin, G.H., Jenkins, B., Porter, A.C., Carey, N.H., *Nature*, **283**, 10 (1980).
24. Fanconnier, B., Ruffault, A., comunicare Acad. Sci. Paris, 5 februarie (1980).
25. Fothergill, L.A., Fothergill, J.E., *Biochem. J.*, **116**, 555 (1970).
26. Fraser, T.H., Bruce, B.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **75**, 5936 (1978).
27. Friedman, R.M., *Pharmacol. Ther.*, **2**, 5425 (1978).
28. Fritsch, A., Pourcel, C., Charnay, P., Tiollais, P., *C.R. Acad. Sci. Paris*, **287**, 1453 (1978).
29. Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., Charnay, P., *Nature*, **281**, 646 (1979).
30. Garapin, A.C., Cami, B., Roskam, W., Kourilsky, P., LePennec, J.P., Perrin, F., Gerlinger, P., Cocher, M., Chambon, P., *Cell*, **14**, 629 (1978a).
31. Garapin, A.C., LePennec, J.P., Roskam, W., Perrin, F., Cami, B., Krust, A., Breathnach, R., Chambon, P., Kourilsky, P., *Nature*, **273**, (1978b).
32. Gilbert, W., *Nature*, **271**, 501 (1978).
33. Gilbert, W., Gralla, J., Majors, J., Maxam, A., în „*Protein-ligand interactions*", ed. H. Sund & G. Blauer (Berlin), p. 193 (1975).
34. Goedell, O.V., Kleid, D.G., Bolivar, F., Heyneker, H.J., Yansura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewsky, A., Itakura, K., Riggs, A.D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 106 (1979).
35. Goldstein, L.D., Georgiadis, J.A., Longford, M.P., *IRCS Med. Sci.*, **7**, 560 (1979).
36. Havell, E.A., Vilcek, J., în „*In vitro Monography*", **3**, 47 (1974).
37. Havell, E.A., Yip, Y.K., Vilcek, J., *J. Gen. Virol.* **38**, 51 (1978).
38. Hirsch, S.M., Swartz, M.N., *New Engl. J. Med.*, **302**, 947 (1980).
39. Hoeijmakers, J.H.J., Borst, P., van der Burg, J., Wrissmann, C., Cross, G.A.M., *Gene*, **8**, 391 (1980).
40. Humphries, P., Cochet, M., Krust, A., Gerlinger, P., Kourilsky, P., Chambon, P., *Nucl. Acids Res.*, **4**, 2389 (1977).
41. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., Boyer, H.W., *Science*, **198**, 1056 (1977).
42. Johnson, H.M., Baron, S., *Cell Immunol.*, **25**, 106 (1976).
43. Kerr, I.M., Brown, R.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **75**, 256 (1978).
44. Klessig, D., *Cell*, **12**, 9 (1977).
45. Knight, jr.E., *J. Biol. Chem.*, **250**, 4139 (1975).
46. Knight, jr. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **73**, 520 (1976).
47. Knight, jr. E., Hunkapiller, M.W., Khorana, G.H., Hardy, R., W.F., Hood, L.E., *Science*, **207**, 525 (1980).
48. Kronenberg, H.M., McDevitt, R.F., Majzouh, J.A., Nathans, J., Sharp, P.A., Potts, J.P., Rich, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 4981 (1979).
49. Lai, E.C., Woo, S.L., Dugaiczyk, A., Catterall, J.F., O'Malley, B.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **75**, 2205 (1978).
50. Laver, W.G., Virology, **45**, 275 (1971).

51. Mandel, J.L., Breathnach, R., Gerlinger, P., LeMeur, M., Gannon, F., Chambon, P., *Cell*, **14**, 641 (1978).
52. Mantei, M., ş.a., *Gene*, **10**, 1 (1980).
53. McKnight, G.S., *Cell*, **14**, 403 (1978).
54. McReynolds, L.A., Catterall, J.F., O'Malley, B.W., *Gene*, **2**, 217 (1977).
55. McReynolds, I.A., O'Malley, B.W., Nisbet, A.D., Fothergill, J.E., Givol, D., Fields, S., Robertson, M., Brownlee, G.G., *Nature*, **273**, 723 (1978).
56. Mercereau-Puijalon, O., Royal, A., Cami, B., Garapin, A., Krust, A., Gannon, F., Kourilsky, P., *Nature*, **275**, 505 (1978).
57. Miller, J.H., în *„Experiments in molecular genetics"*, Cold Spring Harb. Lab., Cold. Spring Harbor (New York), p. 395 (1972).
58. Nagata, S., Tairo, H., Hall, A., Johnsrud, L., Streuli, M., Ball, W., Cantell, K., Weissmann, C., *Nature*, **284**, 316 (1980).
59. Ohori, H., Omadera, S., Ishida, N., *J. Gen. Virol.*, **43**, 423 (1979).
60. Okamura et al., *Biochemistry*, **19**, 3831 (1980).
61. Oxman, M., *Tex. Rep. Biol. Med.*, **35**, 230 (1977).
62. Palese, P., *Cell*, **10**, 1, (1977).
63. Palese, P., Shulman, J.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **73**, 2142 (1976).
64. Palmiter, R.D., *Cell*, **4**, 189 (1975).
65. Palmiter, R.D., Gagnon, J., Walsh, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **75**, 94 (1978).
66. Pasek, M., Goto, T., Gilbert, W., Zink, B., Schaller, H., MacKay, P., Leadbetter, G., Murray, K., *Nature*, **282**, 575 (1979).
67. Pons, M.W., *Virology*, **69**, 789 (1976).
68. Porter, A.G., Barber, C., Carey, N.H., Hallewell, K.A., Theelfall, G., Emtage, J.S., *Nature*, **282**, 471 (1979).
69. Rembach, A., Hogness, D.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **74**, 5041 (1977).
70. Redecker, A., *Am. J. Med. Sci.*, **270**, 9 (1975).
71. Riggs, A.D., Itakura, K., *Am. J. Hum. Genet.*, **31**, 531 (1979).
72. Ritchey, M.B., Palese, P., Shulman, J.L., *J. Virol.*, **20**, 307 (1976).
73. Roberts, J.L., Seeburg, P.H., Shine, J., Herbert, E., Baxter, J.D., Goodman, H.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 2153 (1979).
74. Robinson, W.S., *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 357 (1977).
75. Robinson, W.S., Sattler, F., Siddiqui, A., *„Max Pettenkofer Intern. Symp. on Viral Hepatitis"*, München 5—7 aprilie (1979).
76. Rubinstein, M., Rubinstein, S., Familletti, P.C., Miller, R. S., Walman, A.A., Pestka, S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 640 (1979).
77. Sambrook, J., *Nature*, **286**, 101 (1977).
78. Samuel, C.E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 610 (1979).
79. Sanger, F., Air, G.M., Burrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, J.C., Hutchinson, C.A. III, Slocombe, P.M., Smith, M., *Nature*, **265**, 687 (1977).
80. Schmidt, A., Chernajowksy, Y., Shulman, L., Federman, P., Berissi, H., Revel, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **76**, 4788 (1979).
81. Shope, R.E., *J. Exp. Med.* **54**, 373 (1931).
82. Smith, W., Andrewes, C.H., Laidlow, P.P., *Lancet*, **2**, 66 (1933).
83. Steiner, D.F., Cunningham, D., Spiegelman, S., *Science*, **157**, 697 (1967).
84. Stewart, II W.E., ş.a., *Nature*, **286**, 110 (1980).
85. Streuli, M., Nagata, W., Weissmann, C., *Science*, **209**, 1343 (1980).
86. Struhl, K., Cameron, R.J., Davies, R.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **73**, 1471 (1977).
87. Szmuness, W., *Annu. J. Path.*, **81**, 629 (1975).
88. Tacon, W.A., Carey, N.H., Emtage, J.S., *Mol. Gen. Genet.*, citat de Emtage şi colab. (1980).
89. Taniguchi, T., Ohno, S., Fujii-Kuriyama, Y., Muramatsu, Y., *Gene*, **10**, 11 (1980).
90. Taira, H., ş.a., *Science*, **207**, 528 (1980).
91. Törma, E.T., Poucker, K., *J. Biol. Chem.*, **251**, 4810 (1976).

92. Tilghman, S.M., Curtis, P.J., Tiemeier, D.C., Leder, P., Weissmann, C., *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.*, **75**, 1309 (1978).
93. Ullrich, P., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W.J., Goodman, H.W., *Science*, **196**, 1313 (1977).
94. Ward, C.W., Dopheide, T.A., *Brit. Med. Bull.*, **35**, 51 (1979).
95. Waterfield, M.D., Espelie, K., Elder, K., Skehel, J.J., *Brit. Med. Bull*, **35**, 57 (1979).
96. Weinstock, R., Sweet, R., Weiss, M., Cedar, H., Axel, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **75**, 1299 (1978).
97. Wiley, D.C., Skehel, J.J., Waterfield, M.D., *Virology*, **79**, 446 (1977).
98. Zoon, K.C., Smith, M.E., Briolgen, P.J., Anfinsen, C.B., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., *Science*, **207**, 528 (1980).

X. Perspective

Realizările menționate în capitolul anterior nu sînt singurele, dar spațiul pe care îl avem la dispoziție nu permite inventarierea tuturora. Considerăm însă că cele prezentate demonstrează în mod convingător că în momentul de față nu există nici un obstacol major în calea realizării de către bacterii a unor produse caracteristice organismelor superioare. Prin urmare, este poate util să conturăm unele perspective pe care le are tehnologia DNA recombinant în diferite domenii, și, în principal, perspectivele introducerii de gene procariote la organismele superioare.

X.1. Perspective în medicină și în industria farmaceutică

Principalele perspective care se conturează la orizont în acest domeniu sînt următoarele:

— producția de hormoni;
— producția de antigene;
— producția de anticorpi;
— producția de enzime;
— producția de reactivi necesari diagnosticului;
— posibilitatea de a preveni și vindeca unele maladii ereditare, precum și cancerul.

Întrucît producția unor hormoni, antigene, anticorpi și enzime prin tehnologia DNA recombinant s-a și realizat, problema principală care se pune pentru viitor este utilizarea noii tehnologii la obținerea altor produși de acest fel care, în momentul de față, sînt fabricați prin procedee clasice, la un preț de cost ridicat, motiv pentru care utilizarea

lor în terapie este limitată. Dată fiind această situație, în continuare se vor analiza doar unele perspective legate de:

— obținerea de produse noi necesare diagnosticului medical;

— prevenirea și tratarea maladiilor ereditare, vindecarea cancerului.

X.1.1. Diagnosticul prenatal

Într-o lucrare recentă (1978) Kan și Dozy au arătat în mod clar că există posibilitatea de a introduce metodele tehnologiei DNA recombinant și în diagnosticul prenatal. În acest scop autorii recomandă utilizarea analizei de restricție și hibridizare a DNA fetal. Metoda are toate șansele ca în viitor să fie generalizată pentru diagnosticul prenatal al maladiilor genetice grave.

X.1.2. Prevenirea și vindecarea unor maladii ereditare

Există o serie întreagă de maladii ereditare cauzate de dereglări apărute în metabolismul unor aminoacizi din organismul uman sau animal. Astfel de maladii sînt fenilcetonuria, tirozinoza, albinismul și alcaptonuria.

Fenilcetonuria se manifestă metabolic prin imposibilitatea organismului uman de a oxida acidul fenipiruvic la acid *p*-hidroxifenilpiruvic corespunzător. În consecință, acidul fenilpiruvic se acumulează și este excretat în urină. Indivizii care excretă această substanță în locul produșilor ei de degradare sînt în mod invariabil deficienți mintali, fiind clasificați ca idioți.

Tirozinoza este caracterizată de imposibilitatea organismului de a converti acidul *p*-hidroxifenilpiruvic în acid 2,5-dihidroxifenilacetic care, în mod normal, se degradează în CO_2 și apă. În consecință, bolnavii de tirozinoză au cantități mari de acid *p*-hidroxifenilpiruvic în urină.

Organismul uman (sau animal) normal are capacitatea de a oxida tirozina pînă la 3,4-dihidroxifenilalanină (cunoscută sub denumirea de DOPA). DOPA este un precursor al pigmentului melanină care dă culoare părului, pielei și ochilor. Există însă indivizi care se nasc cu păr alb, piele care nu se bronzează și iris roz. Cercetările au arătat că în organismul lor nu se produce conversia a 3,4-dihidroxifenilalaninei în melanină, motiv pentru care respectivii devin albinoizi.

Alcaptonuria este una dintre cele mai vechi maladii ereditare cunoscute. Ea rezultă în urma unei reacții de blocare care intervine în catabolismul fenilalaninei și al tirozinei. În mod normal, în organismul uman fenilalanina și tirozina sînt oxidate la acid fenilpiruvic și, respectiv

acid *p*-hidroxifenilpiruvic. Printr-o serie de reacții succesive, acidul *p*-hidroxifenilpiruvic este transformat în acid 2,5-hidroxifenilacetic (acid homogentisic cunoscut și sub denumirea de alcapton). Acidul 2,5-hidroxifenilacetic (alcaptonul) este în final degradat în CO_2 și apă. Indivizii care nu pot degrada alcaptonul, îl acumulează întîi în sîngele lor și apoi îl elimină în urină. Prezența alcaptonului în urină este ușor de recunoscut, deoarece în acest caz urina devine neagră după expunerea ei la aer.

Studiul biochimic al serului bolnavilor de alcaptonurie a arătat că indivizii afectați nu au enzima care catalizează reacția de oxidare a alcaptonului. Este vorba de homogentizatoxidaza. De aici a rezultat că, la fel ca și în celelalte maladii menționate, boala este provocată de lipsa unei enzime necesare degradării produșilor intermediari ai fenilalaninei și tirozinei. Mergînd mai departe, s-a ajuns la concluzia că anomaliile metabolismului fenilalaninei și tirozinei sînt provocate de genele represive care în stare homozigotă determină blocarea catabolismului

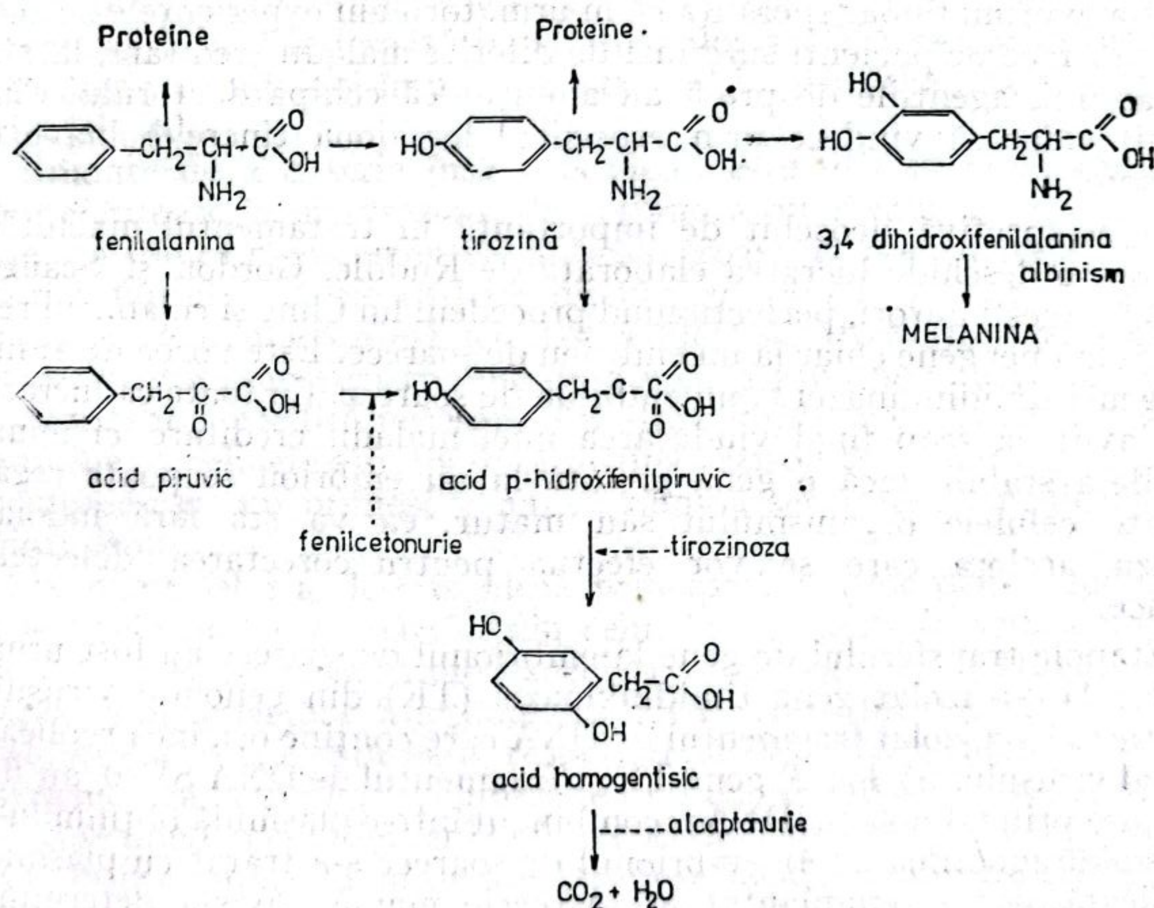


Fig. 91. Principalele reacții ale catabolismului fenilalaninei și tirozinei. Săgețile întrerupte indică locul unde se produce dereglarea catabolismului, cu apariția unor boli metabolice ereditare.

acestor aminoacizi. Schema reacțiilor metabolismului aminoacizilor menționați este redată în fig. 91.

Perspectiva pe care o oferă tehnologia DNA recombinant în vindecarea maladiilor metabolice ereditare sau de altă natură, cum ar fi de exem-

plu anemia falciformă, constă în introducerea prin intermediul unui vehicul adecvat la indivizii afectați, a genelor necesare sintezei componentelor care lipsesc. Această perspectivă se va realiza în curînd, pentru că ceea ce Luria a prezis acum cinci ani, și anume că „se va putea introduce o genă normală în corpul unui individ viu prin injectarea unei soluții de DNA conținînd gena normală", s-a și realizat pe animale de experiență. Este interesant de menționat că Luria, cu geniul său de vizionar, a descris principiile de bază ale „tratamentului cu gene" efectuat pentru prima oară în 1980. „Ceea ce este posibil să se facă — spunea Luria — este să se recolteze celule de la un pacient, celulele să fie cultivate în laborator, în ele să se introducă genele dorite, și apoi să fie restituite corpului pacientului". Or, metodologia utilizată de Cline și colab. (1980), care va fi descrisă mai departe, pentru introducerea unei gene noi în genomul unor șoareci, este aproape identică. Dacă la începutul anului 1980 s-a exprimat doar speranța că în următorii ani experiențele de acest fel se vor face pe pacienți suferinzi de diferite maladii ereditare, la sfîrșitul anului, agențiile de presă au anunțat că echipa doctorului Cline a reușit chiar să vindece prin procedeul lor două tinere bolnave de talasemie.

O perspectivă deosebit de importantă în tratamentul maladiilor ereditare o deschide lucrarea elaborată de Ruddle, Gordon și Scaugos (1980) *. Acești autori, perfecționînd procedeul lui Cline și colab., au realizat grefa unei gene chiar la un embrion de șoarece. Este vorba de transferul genei timidinkinazei la un embrion de șoarece. Cu toate că lucrarea nu a avut ca scop final vindecarea unei maladii ereditare ci numai acela de a stabili dacă o genă grefată la un embrion se poate regăsi în toate celulele organismului său matur, ea va sta fără îndoială la baza acelora care se vor efectua pentru corectarea defectelor genetice.

Etapele transferului de gene la embrionul de șoarece au fost următoarele: 1) s-a izolat gena timidinkinazei (TK) din genomul virusului herpetic; 2) s-a izolat fragmentul de DNA care conține originea replicării DNA al virusului SV40; 3) gena TK și fragmentul de DNA SV40 au fost introduse prin tehnologia DNA recombinant într-o plasmidă obținîndu-se o plasmidă modificată; 4) embrionul de șoarece s-a tratat cu plasmida modificată și s-a reimplantat la șoarecele mamă; 5) s-a determinat activitatea timidinkinazică a șoarecilor proveniți din embrionii tratați.

Din 78 de embrioni astfel tratați numai unul a prezentat activitate timidinkinazică a celulelor sale. Randamentul de transfer de genă TK a fost deci foarte mic. Se speră însă ca prin modificarea procedeului eficiența integrării și exprimării genei să fie mult îmbunătățită. De asemenea, mai rămîne să se stabilească, ceea ce este extrem de important,

---

* Lucrare comunicată la al 2-lea Congres Internațional de biologie celulară, Berlin, sept. 1980.

şi, anume, dacă gena grefată se transmite sau nu descendenţilor. De fapt, acest rezultat va arăta dacă gena a fost corect introdusă în genomul şoarecelui.

X.1.3. Tratamentul cancerului

Cline şi colab. (1980) au pus la punct un procedeu nou prin care celulele măduvei osoase (producătoare de elemente sanguine) ale şoarecilor, devin rezistente la un medicament anticanceros foarte eficace dar şi foarte toxic cunoscut sub denumirea de metotrexat. Acest procedeu poate deveni în curînd un complement de prim ordin pentru tratamentele clasice ale cancerului.

Procedeul lui Cline nu se bazează pe tehnologia DNA recombinant. Însă, datorită faptului că implicaţiile sale în medicina umană vor fi imense, vom descrie succint caracteristicile sale principale. Mai există şi următorul motiv: după cum se va vedea, procedeul lui Cline este susceptibil de a fi îmbunătăţit, iar tehnologia DNA recombinant va fi aceea care va contribui în mod substanţial la generalizarea şi creşterea eficienţei sale.

Înainte de a descrie însă procedeul, este util să precizăm unele date referitoare la mecanismul de acţiune a unor substanţe anticanceroase. Se ştie că medicamentele anticanceroase au o eficacitate limitată datorită faptului că ele distrug nu numai celulele maligne ci şi cele sănătoase. Pentru a proteja selectiv celulele sănătoase faţă de acţiunea medicamentului, acestea trebuie dotate cu o genă nouă care să le confere rezistenţa specifică necesară. Cu alte cuvinte, gena nouă trebuie să determine ca celulele sănătoase să devină rezistente, în timp ce, celulele canceroase care nu primesc gena, să rămînă sensibile la medicamentul anticanceros.

În acest fel s-a descris ideea principală a procedeului lui Cline. Etapele sale sînt următoarele: din celulele rezistente la acţiunea metotrexatului (selecţionate în mod special) se extrage DNA. După cum se va arăta mai departe, o fracţiune din DNA extras din celulele rezistente la metotrexat reprezintă gena responsabilă de sinteza enzimei dihidrofolatreductază (DHFR) *. Paralel se extrage măduva osoasă de la şoarece şi se pune în contact cu DNA extras din celulele rezistente la metotrexat în prezenţă de ioni de Ca^{2+}. Sub influenţa ionilor de Ca^{2+}, (care măresc permeabilitatea membranei) DNA pătrunde în celulele măduvei osoase şi printr-un mecanism încă insuficient cunoscut se combină

* De precizat că metotrexatul acţionează asupra celulelor prin inhibarea acţiunii DHFR, enzimă indispensabilă celulei; DHFR determină transformarea acidului dihidrofolic în acid tetrahidrofolic, iar acesta din urmă este implicat direct în sinteza proteinelor celulare indispensabile vieţii celulelor. Prin urmare, celulele rezistente la acţiunea metotrexatului au gena pentru DHFR amplificată de mai multe ori.

cu DNA propriu. În urma acestei interacții (recombinări) se produce transferul genei responsabile de sinteza DHFR de la celulele rezistente la acțiunea metotrexatului la celulele măduvei osoase. Transferul genei a fost dovedit astfel: în cavitatea peritoneală a șoarecilor s-au inoculat celulele de măduvă osoasă tratate cu DNA conținînd gena de rezistență la metotrexat (producătoare de DHFR). În mod curios aceste celule au ajuns exact în măduva osoasă unde s-au multiplicat, iar după cîteva zile de la injectarea lor au sintetizat chiar globule albe și roșii. Proba finală a constat în tratamentul acestor șoareci cu doze din ce în ce mai mari de metotrexat. S-a observat că animalele astfel tratate sînt rezistente la metotrexat, ceea ce a dovedit că transferul de genă a fost realizat. Prin urmare, în procedeul lui Cline gena a fost transferată prin intermediul unui DNA întreg. Fără îndoială că procedeul se va îmbunătăți în momentul în care se va lucra numai cu gene de interes.

Întrucît gena responsabilă de sinteza DHFR a fost localizată într-un cromozom este posibil ca în viitorul apropiat ea să fie separată, clonată și amplificată prin tehnologia DNA recombinant. Ca atare, atît această genă cît și altele vor putea fi introduse mult mai eficient în celulele ale căror proprietăți trebuie modificate.

De asemenea, sînt mari speranțe în folosirea tehnologiei DNA recombinant în prevenirea și tratamentul cancerului, generate de cercetările care au realizat cartarea genoamelor unor virusuri oncogene. În momentul de față, pentru unele din aceste virusuri s-au și precizat atît zonele moleculare ale acidului nucleic responsabile de transformarea celulelor normale în celule canceroase, cît și componentele proteice care intervin în cursul acestui proces. Or, identificarea la nivel molecular a unor componente care condiționează transformarea celulară oferă posibilitatea înțelegerii mecanismului de transformare și, totodată, deschide perspectiva găsirii căilor celor mai eficiente de a preveni sau trata cancerul.

X.2. Perspective în domeniul agro-alimentar

Asigurarea resurselor de hrană pentru întreaga populație — astăzi ajunsă la o cifră de 4,5 miliarde de oameni — este una din cele mai stringente probleme căreia trebuie să-i găsească răspuns umanitatea. Complexitatea acestei probleme, generată în mare măsură și de faptul că întinse zone ale planetei sînt atinse de flagelul subdezvoltării, face însă ca răspunsul să întîrzie.

Este evident că găsirea unor soluții viabile pentru problema alimentației se află într-o relație strînsă și nemijlocită cu creșterea într-un ritm susținut a producției agricole mondiale, în special a producției cerealiere. Care este însă situația pe plan mondial? Între anii 1971—75,

ritmul mediu anual de creştere a producţiei agricole mondiale a fost de 1,2%, apropiat de cel al creşterii demografice, menţinînd problema alimentaţiei, practic, în aceleaşi limite — ritmul de creştere ar fi trebuit să fie cel puţin dublu pentru a se putea începe un proces real de înlăturare a fenomenelor negative, generate de foamete. În anii următori, 1976—1978, în zonele cele mai afectate de flagelul lipsei cronice de alimente s-a înregistrat chiar un regres al producţiei agricole.

Aşa stînd lucrurile, în aceste condiţii se poate pune întrebarea dacă problema alimentaţiei este sau nu rezolvabilă? Este evident că ea poate fi soluţionată. Ar fi suficient să amintim în acest sens că dacă în Europa suprafeţele cultivabile sînt folosite aproape integral, în America de Sud şi Africa abia ating 33% şi, respectiv 21%.

Deci o cale ar fi cultivarea unor terenuri suplimentare. Aceasta ar atrage — bineînţeles — fertilizarea noilor suprafeţe, în vederea creşterii recoltelor. Dar aici se ridică o nouă problemă: consumul de energie necesar producerii de îngrăşăminte azotoase este imens; după unii autori anual se folosesc în acest scop peste 20 milioane barili de petrol. Însă lucrurile nu se limitează aici. Transportul şi plasarea adecvată a îngrăşămintelor azotate implică şi alte cheltuieli suplimentare.

O altă cale de realizare de recolte mai bogate este oferită de tehnologia DNA recombinant, prin transferul genelor fixatoare de azot, la plantele de interes major din punct de vedere al alimentaţiei. Se ştie că fixarea azotului din atmosferă se produce în sol, de către unele bacterii cum ar fi *Azotobacter vinelandii*, *Klebsiella pneumoniae*, precum şi în unele plante care au simbionţi procariotici fixatori de azot. Dintre aceste plante însă nu fac parte nici cerealele care asigură recoltele majore (grîul, porumbul, orezul), nici iarba — furnizorul major de furaj, ci leguminoasele (trifoi, lucernă, fasole, mazăre, lupin) care trăiesc în simbioză cu bacterii de tip *Rhizobium*, motiv pentru care cultivarea lor nu mai necesită îngrăşăminte pe bază de azot.

Bacteriile menţionate reuşesc să fixeze azotul atmosferic — proces fundamental în ciclul azotului în natură, care condiţionează însăşi viaţa organismelor, — graţie faptului că ele sînt dotate cu un sistem enzimatic specific, denumit sistem nitrogenazic. Aceste bacterii au în genomul lor gene *nif*, care codifică proteinele din sistemul enzimatic complex al nitrogenazelor, responsabil de transformarea azotului molecular atmosferic în compuşi organici. Fixarea biologică a azotului atmosferic se face prin reacţii enzimatice, la energie joasă, avînd şi avantajul autoreglării în funcţie de necesităţile organismului fixator de azot. Eliminarea îngrăşămintelor cu azot din practica agricolă ar permite deci şi reducerea investiţiilor din industria chimică, concomitent cu îndepărtarea efectelor negative ale îngrăşămintelor, ceea ce va duce la eutrofizarea rîurilor şi lacurilor, la depoluarea unor surse de apă potabilă etc.

Se speră ca, alături de obținerea prin tehnologia DNA recombinant a unor proteine de tipul ovalbuminei, care ar putea contribui la rezolvarea „foamei de proteine", să se reușească prin aceeași tehnologie și obținerea în laborator a noi tipuri de plante — cereale și plante furajere — capabile să-și fixeze singure azotul atmosferic de care au nevoie, ceea ce va asigura și necesarul de hrană bine echilibrată în aminoacizi pentru om și animale în țările slab dezvoltate.

X.2.1. Fixarea biologică a azotului atmosferic

Pentru ca procesul biologic de fixare a azotului atmosferic să devină în viitor un factor productiv, numeroși cercetători și-au consacrat activitatea cunoașterii mecanismelor moleculare și biochimice care intervin în acest proces.

În anii '60 s-a stabilit că fixarea biologică a azotului atmosferic este condiționată de un sistem enzimatic complex, denumit *nitrogenază*, al cărei rol constă în reducerea azotului ($N \equiv N$) la amoniac NH_3 (amoniu NH_4^+). Lucrîndu-se în absența aerului, în condițiile conservării activității enzimatice (aerul determină dispariția activității respective), s-au putut izola sisteme enzimatice nitrogenazice din diverse microorganisme. S-a constatat că nitrogenaze provenind din surse diferite prezintă o mare asemănare din punct de vedere chimic și structural. Sistemul enzimatic al nitrogenazelor este format din două componente proteice diferite:

a) o proteină mare, cu structură tetramerică (masă moleculară 250000 D), care conține doi atomi de molibden și 32 atomi de fier (legați de atomi de sulf printr-o legătură labilă în mediu acid) — denumită *molibdoferredoxina* sau, pe scurt, *proteina Mo-Fe*;

b) o proteină cu dimensiuni mai reduse, avînd structură de dimer (masa moleculară 60000 D), care conține 4 atomi de fier (legați labil de atomi de sulf) — denumită *azoferredoxină* sau, pe scurt, *proteina Fe*.

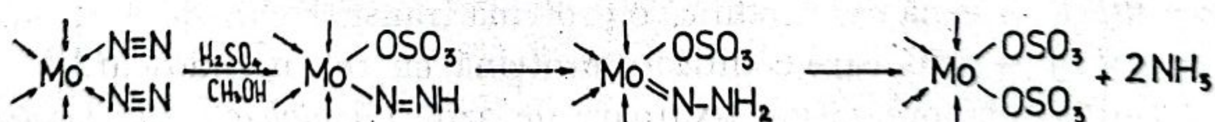
Nitrogenaza este activă numai atunci cînd conține ambele specii de proteine, pentru că nici una dintre cele două componente nu este enzimatic activă ca atare. Adeseori se pot reconstitui nitrogenaze hibride, prin amestecarea unei unități de proteină Mo—Fe de la o specie, cu proteină Fe de la o altă specie de microorganism fixator de azot. De exemplu, proteina Mo—Fe din *Klebsiella pneumoniae* formează o enzimă deosebit de activă împreună cu proteina Fe de la *Azotobacter chroococcum* sau *Bacillus polymyxa*. În alte cazuri, hibridul rezultat este parțial sau chiar deloc activ.

Similitudinea biochimică a nitrogenazelor merge și mai departe. Astfel toate sistemele de fixare a azotului cunoscute pînă în prezent au nevoie de agenți reducători naturali asemănători, reprezentați de mici proteine cu caracter reducător, conferit de gruparea lor proste-

tică: *flavodoxinele* și *ferredoxinele*. În plus, funcționarea tuturor sistemelor nitrogenazice necesită prezența ATP, ca furnizor de energie, și Mg^{2+}. S-a constatat că aceste enzime complexe pot reduce nu numai legătura triplă din molecula de azot ($N \equiv N$), ci își pot exercita acțiunea și asupra altor substraturi a căror moleculă comportă o triplă legătură (acetilenă $HC \equiv CH$, acid cianhidric $H-C \equiv N$, azidă $H-N-\overline{N}=\overset{+}{N}$, oxid nitros $N \equiv N=O$, pe care le transformă în etilenă $H_2C=CH_2$ și, respectiv metan + amoniac, azot și amoniac, azot și apă). Dealtfel, pe transformarea acetilenă → etilenă se bazează și metoda gaz-cromatografică foarte sensibilă, utilizată astăzi curent, pentru dozarea activității nitrogenazice.

O altă caracteristică comună pentru nitrogenazele de diverse proveniențe este sensibilitatea lor la oxigen; cea mai ușor alterabilă este proteina Fe. Acest fapt a impus punerea la punct a unor metode de purificare a enzimelor în absența aerului și la ora actuală s-a reușit chiar cristalizarea unora dintre aceste proteine!

X. 2.1.1. **Mecanismul de reducere a azotului atmosferic la amoniac.** Mecanismul nu este pe deplin elucidat încă. Se presupune că proteina Mo—Fe „ancorează" substratul, adică azotul molecular, pe molibden. Pe de altă parte, proteina Fe, împreună cu ATP în prezența ionilor Mg^{2+}, ar avea sarcina de a furniza energia necesară inducerii unei stări super-reduse a proteinei Mo—Fe, care constituie partea activă a enzimei. Legarea azotului la atomul de metal tranzițional are loc cu probabila formare a unor complecși diazotați, din care azotul se elimină ca amoniac:



Reacția de formare a unei molecule de amoniac consumă aproximativ 15 molecule ATP. S-ar putea ca numeroșii atomi de fier ai proteinei Mo—Fe să aibă rolul de a „înmagazina" electronii necesari în această reacție de reducere.

Trebuie însă spus că între reacția de fixare biologică a azotului și modul aerob de viață al microorganismului (care furnizează ATP și reducătorii necesari prin procesul de fotosinteză) există o incompatibilitate esențială pe care acesta trebuie să o rezolve. În cursul evoluției, microorganismele respective au adoptat unele stratageme fiziologice care au dus la excluderea — totală sau parțială — a accesului oxigenului la centrul fixator de azot. În acest sens acționează:

— reglarea respirației, în scopul menținerii unei tensiuni mici de oxigen;

— compartimentarea subcelulară, astfel încît enzima atașată la membranele celulare nu este sensibilă la oxigen, spre deosebire de enzima liberă care nu rezistă;

— compartimentarea celulară (la unele bacterii albastre-verzi fixatoare de azot există celule mari, specializate, din care lipsesc compușii fotosintetici, necesari degajării oxigenului);

— existența unor sisteme tampon pentru oxigen (în nodulii de pe rădăcinile plantelor leguminoase există o concentrație ridicată de leghemoglobină, pigment cu o mare afinitate pentru oxigen și cu rol de transportor specializat, ferind nitrogenaza de o presiune prea mare de oxigen).

X. 2.1.2. **Genele care controlează sistemul nitrogenazic (genele nif).** Sinteza sistemului enzimatic al nitrogenazei este sub controlul unui grup de gene, denumite gene *nif* (de la „*ni*trogen *f*ixation"), care au fost intens studiate, în special la bacteria fixatoare de azot *Klebsiella pneumoniae*. Analiza transducțională cu bacteriofagii *P*1, *P*2 etc. a permis localizarea regiunii genelor *nif* în cromozomul acestei bacterii, stabilindu-se vecinătatea lor cu operonul pentru biosinteza histidinei.

Conform celor mai recente date de analiză genetică, regiunea genelor *nif* cuprinde aproximativ 15 cistroni, grupați în 6 unități de transcriere cu rol cunoscut; s-a sugerat următoarea expresie fenotipică a genelor:

— *nif* H, *nif* D, *nif* K — gene structurale pentru nitrogenază, transcrise în această ordine; genele *nif* D și *nif* K codifică subunitățile proteinei Mo—Fe, iar *nif* H codifică subunitatea proteinei Fe;

— *nif* A — genă reglatoare;

— *nif* B — genă implicată în sinteza proteinei Mo—Fe;

— *nif* F — genă care codifică o proteină transportoare de electroni;

— *nif* J — genă care codifică o proteină cu rol necunoscut.

La alte microorganisme fixatoare de azot (*Azotobacter vinelandii*, *Rhizobium*) organizarea genelor *nif* în cromozom nu este încă complet lămurită, dar se pare că ele nu se află într-o zonă unică, ci sînt repartizate în mai multe locuri.

Alături de cunoașterea localizării și rolului genelor *nif*, prezintă importanță și cunoașterea mecanismului de biosinteză a nitrogenazei. S-a constatat că atunci cînd bacteriile fixatoare de azot sînt cultivate în prezența unor cantități suficiente de azot fixat — azotați sau săruri de amoniu — biosinteza enzimei nu se mai produce, deoarece nu mai are loc transcrierea mesagerilor corespunzători. Pentru explicarea acestei represii a exprimării genei nitrogenazei s-a propus un model de sistem enzimatic în cascadă, în care un rol de prim-ordin revine glutaminsintetazei (GS). Această enzimă mediază formarea glutaminei, rezervorul de amoniu pentru biosinteza a numeroase substanțe organice

azotate. Se pare însă că GS nu este decît un element din complicatul mecanism de reglare a biosintezei nitrogenazei la fixatorii liberi.

Problema biosintezei sistemului nitrogenazic în cadrul simbiozelor de tip *Rhizobium* — leguminoase (cu rol major în agricultura mondială, ele fiind independente de aportul de îngrășăminte chimice azotate) este cu mult mai complexă decît în cazul microorganismelor fixatoare libere (de exemplu *Klebsiella pneumoniae*) și trebuie spus că, spre deosebire de progresele înregistrate în cunoașterea geneticii bacteriilor din grupul *Rhizobium*, cunoștințele asupra participării genomului plantei-gazdă sînt mult mai reduse. În acest caz s-au descris relativ puține gene, iar funcționarea lor este în mare parte necunoscută.

X.2.2. Posibilități de valorificare a fixării biologice a azotului

Sarcinile din ce în ce mai mari privind sporirea producției agricole, în condițiile penuriei tot mai accentuate a resurselor energetice convenționale, au impus necesitatea creării de noi soiuri de plante de interes economic major, soiuri care să fie capabile să fixeze azotul atmosferic fie prin simbioză cu bacterii fixatoare, fie singure — prin asimilare directă de către celulele proprii. În acest scop, s-au propus mai multe variante.

X. 2.2.1. **Ameliorarea unor asociații simbiotice naturale.** În ultima vreme s-au detectat — chiar și în țara noastră — microorganisme din genul *Azospirillum*, care trăiesc pe suprafața sau în interiorul rădăcinilor unor cereale (grîu, porumb) sau ale unor graminee furajere. Aceste bacterii au capacitatea de a fixa azotul atmosferic. Prin inginerie genetică s-a reușit obținerea unor tulpini hiperfixatoare de azot, tulpini ce dau mari speranțe de aplicabilitate practică.

X. 2.2.2. **Transferul genelor nif de la celule procariote la celule eucariote.** O altă cale de ameliorare genetică a unor plante pe baza tehnologiei DNA recombinant, prin care se speră crearea unor soiuri noi, capabile să fixeze azotul atmosferic în mod autonom, o reprezintă transferul regiunii genelor *nif*, sub controlul cărora se află biosinteza nitrogenazei (responsabilă de fixarea azotului liber) de la bacterii la plante superioare. De menționat că, pînă în prezent, prin intermediul plasmidelor s-a reușit doar:

— transferul și exprimarea genelor *nif* de la o gazdă bacteriană *(Klebsiella pneumoniae)* la gazde bacteriene înrudite (tot din familia *Entrobacteriaceae: Escherichia coli, Klebsiella aerogenes, Salmonella thyphimurium)*, care au mecanisme de protecție față de oxigen, precum și informația genetică auxiliară necesară pentru fixarea azotului molecular;

— transferul genelor *nif* la gazde bacteriene neînrudite *(Agrobacterium tumefaciens*, o mutantă nefixatoare de *Azotobacter vinelandii)*;

în acest caz transferul a reușit doar la *Azotobacter*, celorlalte specii lipsindu-le — probabil — sistemul protector față de oxigen. Aceste încercări de transfer au un caracter mai mult teoretic, decît practic, deoarece este de presupus că introducerea în sol a noilor specii bacteriene, obținute pe această cale, nu ar duce la creștere semnificativă a azotului fixat, în ideea că supraviețuirea și multiplicarea acestor microorganisme nu ar avea de suferit.

Ca atare, pe baza experienței acumulate se speră că în viitor se va ajunge și la transferul direct al genelor *nif* de la procariote în celulele plantelor eucariote. Trebuie însă precizat că introducerea genelor bacteriene în plantele superioare este stînjenită de anumite bariere naturale care se manifestă la nivelul penetrării în celula vegetală, al menținerii și exprimării lor corecte, al replicării și repartiției în celule. O parte din aceste impedimente vor putea fi depășite grație culturilor de protoplaști lipsiți de perete celular și care pot îngloba macromolecule, organite celulare sau organisme monocelulare. Ulterior protoplaștii fuzionați pot reface plante întregi. O altă posibilitate de transfer a genelor *nif* la plantele superioare o oferă unele virusuri ale plantelor (de exemplu, virusul mozaicului conopidei) sau unele plasmide existente în mod natural, cum ar fi plasmida Ti (din *Agrobacterium tumefaciens*). Folosirea acestor vehicule întîmpină însă o oarecare rezistență deoarece pe această cale s-ar putea răspîndi unele boli la plante.

Pe baza materialului prezentat se poate deci afirma că, la ora actuală există posibilitatea de a proiecta obținerea unor plante noi, fixatoare directe de azot molecular din atmosferă, care să realizeze recolte bogate fără să aibă nevoie de fertilizatori chimici pe bază de azot.

X.2.3. Alte perspective

Un alt proiect în curs de realizare este transferul la plantele sensibile la frig a genelor care conferă rezistența la frig. Plecînd de la constatarea că există citrice rezistente la frig, dar care produc fructe cu gust neplăcut, se urmărește izolarea genelor responsabile de această proprietate pentru a le transfera la portocali. Se speră ca în acest fel aria de cultivare a portocalilor să fie extinsă spre zone cu climă rece. De fapt problema rezistenței la frig a plantelor are implicații în domeniul cultivării lor, izolarea și transferarea genelor specifice avînd multe consecințe economice pozitive.

În concluzie, se poate aprecia că ingineria genetică oferă o bază reală pentru obținerea de noi soiuri de plante cu proprietăți dintre cele mai variate și utile: rezistență la boli și la frig, capacitatea de a folosi autonom azotul atmosferic, valorificarea energiei solare, recolte sporite etc.

X.3. În domeniul industrial biotehnologia va înlocui petrochimia?

Anul acesta (1980) s-a decis ca „noile forme de viață" create de om prin inginerie genetică — în special bacterii — să poată fi brevetate ca orice invenție sau descoperire. Prin această hotărîre se consideră că a fost pusă baza juridică a ceea ce, pe bună dreptate, s-a numit „revoluția biologică". Momentul „izbucnirii" acestei revoluții poate fi considerat anul 1953, cînd s-a descris pentru prima dată structura DNA de către Watson și Crick, iar momentul ei culminant se situează douăzeci de ani mai tîrziu, adică în 1973, cînd s-a descris pentru prima oară tehnologia DNA recombinant.

Dezvoltarea impetuoasă a acestei tehnologii, cu ajutorul căreia s-a realizat distrugerea barierelor naturale dintre specii, a avut ca rezultat impactul direct dintre biologie și industrie, asemănător celui produs anterior de fizică. Acest impact a determinat ca o serie de state să investească sume apreciabile în dezvoltarea biotehnologiei *. Pentru a cita un singur exemplu, numai țările Pieței comune au un proiect în valoare de 16 milioane lire pentru dezvoltarea biotehnologiei în perioada 1981—1985. Principalele firme industriale care se ocupă de producția unor medicamente cu ajutorul microorganismelor modificate prin tehnologia DNA recombinant sînt: „Genentech" (San Francisco, S.U.A.), fondată în 1976, axată pe producția de somatostatină, insulină; „Ely Lilly" (S.U.A.) — producție de insulină; „Cetus" (Berkeley, S.U.A.) — producție de alcooli; „Genex" (Bethesda, S.U.A.) — producție de coloranți, detergenți, cauciuc sintetic; „Biogen" fondată în 1979, societate internațională cu fonduri americane — producție de interferon; „Searle" (Anglia) — producție de antigene virale; „Transgène" (Strassbourg, Franța) fondată în 1980.

X.3.1. Industria fermentativă și problema energiei

După cum se știe, industria fermentativă bazată pe procedeele convenționale de microbiologie industrială produce de foarte mulți ani aminoacizi, proteine, nucleotide, alți compuși organici. Problema care se pune cu acuitate în prezent este adaptarea acestei industrii și la obținerea de produși noi, sintetizați de microorganismele nou creiate prin tehnologia DNA recombinant. În plus, apare și problema elaborării unor tehnologii bazate pe surse noi de biomasă, întrucît produsele

* *Biotehnologie* — toate tehnologiile industriale care au la bază procese biologice. (Menționate într-un articol foarte recent elaborat de Hartley, B. — Nature *283*, 122 (1980).

petrochimice devin din ce în ce mai scumpe. În momentul de față biotehnologia aduce o contribuție importantă la rezolvarea problemei energetice. Cu ajutorul ei se produc deja din biomasă vegetală cantități mari de alcooli, utilizați ca înlocuitori ai benzinei. Se speră însă că, în curînd, procedeele convenționale din acest domeniu să fie mult îmbunătățite. Astfel, se studiază posibilitatea realizării fermentației de către microorganisme care trăiesc la temperaturi ridicate. Avantajul major al tehnologiilor de acest fel este că distilarea alcoolului o realizează chiar căldura degajată în cursul fermentației. În consecință, procesul de obținere al alcoolilor devine mai rapid, cu un consum minim de energie.

Un alt proiect în curs de realizare, tot prin fermentație, este conversia celulozei la combustibili lichizi sau gazoși, proces cu ajutorul căruia unele țări europene speră să rezolve o parte a problemelor balanței lor energetice.

Bioconversia energiei solare ar fi o alternativă pentru rezolvarea marilor dificultăți creiate de criza petrolului. Ea constă în fixarea energiei solare cu ajutorul unor plante sau alge fotosintetice. Ameliorarea acestor microorganisme prin tehnologia DNA recombinant, cu îmbunătățirea randamentului de fixare a energiei luminoase și calorice, le va transforma în adevărați convertizori de energie. Din biomasa acestor microorganisme, energia se poate recupera ușor prin fermentație, obținîndu-se alcooli care pot substitui cu succes petrolul.

X.3.2. Industria alimentară

În momentul de față, în alimentația animalelor se folosește ca supliment — în afară de proteina de soia — și proteina sintetizată de unele microorganisme special selecționate și cultivate. Aceste microorganisme, denumite pe scurt SCP *(Single Cell Protein)*, realizează de fapt conversia unor produși secundari în industria petrochimică în proteine. Astfel, procedeul firmei „British Petroleum" folosește pentru cultivarea SCP *n*-alcani obținuți la rafinarea petrolului, firma „Shell" folosește metanul, iar „Imperial Chemical Industries" (ICI) utilizează în același scop metanolul. Se consideră că, din punct de vedere economic, procedeul pus la punct de către ICI este cel mai rentabil. Foarte recent însă, cercetătorii acestei firme, aplicînd tehnicile DNA recombinant au reușit să îmbunătățească producția de SCP și prin aceasta conversia metanolului în proteină.

Cum s-a realizat îmbunătățirea conversiei? Pentru a sintetiza proteina microorganismele au nevoie de azot molecular. În mod obișnuit SCP îl obține din amoniac. S-a observat că tulpina de SCP denumită AS_1 asimilează amoniac pe o cale metabolică energetic ineficientă, utilizînd pentru conversia amoniacului în glutamat enzima glutamatsin-

tetază. Energia necesară a acestei conversii se obține însă prin oxidarea metanolului la CO_2, ceea ce determină un consum excesiv de metanol. Considerîndu-se că există organisme care folosesc alte căi metabolice mult mai avantajoase din punct de vedere energetic, pentru conversia amoniacului în glutamat cu ajutorul glutamatdehidrogenazei, s-a construit o nouă tulpină bacteriană, care a primit gena glutamatdehidrogenazei în locul genei glutamatsintetazei. Din fericire, bacteria *E. coli* — care este foarte bine cunoscută — conține gena dorită, așa că gena a fost excizată de aici și introdusă în tulpina AS_1 de SCP. Mai greu a fost să se izoleze un mutant care să aibă deleția genei glutamatsintetazei. În urma unor cercetări s-a descoperit un mutant termosensibil, la care gena glutamatsintetazei nu operează la temperaturi mai mari de 37°C. La acest mutant s-a grefat gena glutamatdehidrogenazei, iar tulpina nou obținută (care s-a dovedit a fi stabilă) folosește calea metabolică a glutamatdehidrogenazei la temperaturi de peste 37°C. Pe baza acestei modificări randamentul conversiei metanolului în proteină a crescut cu 5%. De precizat că proiectul privind producția SCP a fost lansat în 1968, iar în anul 1976 s-au aprobat 40 milioane lire sterline pentru construcția instalațiilor necesare producerii SCP.

Tot prin tehnologia DNA recombinant se încearcă modificarea microorganismelor superproducătoare de enzime speciale, necesare în industria alimentară. După eliberarea din celule, aceste enzime sînt imobilizate (sau chiar celulele avînd în interiorul lor enzimele de interes sînt imobilizate) și utilizate drept catalizatori în diferite procedee industriale. Un astfel de exemplu este procedeul de obținere a siropurilor de fructoză, cu glucozoizomerază, imobilizată, procedeu utilizat de mai multe firme din S.U.A. și Anglia.

De menționat și faptul că în momentul de față cercetătorii britanici studiază posibilitatea utilizării tehnologiei DNA recombinant la producția taumatinei, o substanță proteică care este de 2500 ori mai dulce decît o soluție de zahăr 10%. Este important de reținut că taumatina, izolată din fructele de *Taumatococcus danielli* (care crește în Africa și a fost descoperit în 1968) nu este toxică. Datorită proprietăților ei deosebite, taumatina este din ce în ce mai mult solicitată pe piața mondială, motiv pentru care se caută îmbunătățirea producției sale.

XI. Biohazardul și măsurile de protecție în tehnologia DNA recombinant

Dacă pînă acum cîțiva ani se putea spune că raporturile dintre oamenii de știință și cetățeni erau, în mod esențial, amicale, în ultimul timp asistăm la unele dispute între aceste categorii de oameni, datorită mai ales consecințelor negative pe care le poate genera ingineria genetică. Aceasta, în principal, deoarece cunoștințele moderne de biotehnologie nu elimină posibilitatea ca microorganismele transformate prin această tehnologie să devină periculoase pentru om și mediul înconjurător. În acest context merită să menționăm conflictul declanșat între Universitatea Harvard și primăria orașului Cambridge (S.U.A.), privind construirea unui laborator de biotehnologie. La baza disputei a stat pe de o parte, dorința oamenilor de știință de a utiliza biotehnologia pentru obținerea de noi informații despre materia vie, de a găsi noi surse de hrană, energie, medicamente etc., iar pe de altă parte, oponenții ei au susținut pe bună dreptate, că aceste cercetări trebuie oprite, întrucît — în momentul de față — nu se pot da garanții absolute de securitate.

Pînă foarte recent, oamenii de știință considerau că nu există nici un argument experimental care să susțină potențialul de biohazard al ingineriei genetice. O dată însă cu izbucnirea „afacerii Birmingham" *, care a costat viața a două persoane, datorită instalațiilor defecte ale

* „Afacerea Birmingham" — cum este denumită de ziariști situația tragică petrecută la Universitatea din Birmingham — a constat, succint, în următoarele: profesorul Bedson, efectuînd în secret în laborator cercetările sale, a creat prin inginerie genetică un hibrid de virus variolic. Acest virus se pare că a reușit să scape din laboratorul profesorului Bedson (faptul nu a putut fi dovedit datorită instalațiilor defecte ale laboratorului (ceea ce s-a dovedit a fi real!). Se pare că acest virus a ajuns în încăperea de la etajul superior laboratorului, unde a produs moartea fotografei Janet Parker. Conștient de greșelile pe care le-a făcut, profesorul Bedson și-a pus capăt zilelor.

unui laborator în care se făceau experiențe de inginerie genetică, a apărut evident pericolul generat de aceste cercetări. Cazul acesta a atras atenția atît asupra riscurilor pe care le poate genera ingineria genetică, cît și asupra cercetărilor clandestine, care se pot efectua în diferite laboratoare și care ar putea fi folosite în scopuri teroriste sau de șantaj.

Se pune deci problema ca, în cazul în care aceste cercetări continuă, să se ia măsuri de protecție eficiente, care să protejeze față de biohazard atît personalul de cercetare, cît și publicul larg, plantele și animalele din mediul înconjurător.

Trebuie precizat de la început că toate instituțiile medicale, veterinare, fitopatologice, microbiologice și virusologice, care lucrează cu materiale biologice periculoase au experiență îndelungată în manipularea acestor materiale. În consecință, laboratoarele instituțiilor menționate, antrenate în cercetări cu virusuri sau microorganisme, au fost astfel construite și amenajate încît ele să ofere garanția nediseminării în mediul înconjurător a germenilor patogeni. Dealtfel, primele cercetări de inginerie genetică au fost efectuate în astfel de laboratoare. În momentul în care progresele ingineriei genetice au permis transferarea genelor de la un organism la altul, indiferent de specia de organism din care provin, și deci crearea unor organisme neîntîlnite în natură avînd proprietăți noi, a apărut necesitatea adoptării unor măsuri suplimentare de securitate, care să corespundă situației noi create. În acest scop, s-a formulat așa-zisa protecție biologică și fizică *(biological and physical containments)*.

Protecția biologică presupune folosirea vectorilor sau/și a gazdelor care, datorită unor mutații sau altor cauze, sînt modificate sau „mutilate" *(crippled)*, în așa fel încît microorganismele conținînd material cenetic schimbat prin inginerie genetică devin incapabile de a supraviețui în natură. Tulpina de bacterie *E. coli K12* este un exemplu tipic, gare îndeplinește aceste condiții.

Protecția fizică presupune folosirea unor laboratoare special amenajate, dispozitive tehnice și fizice de manipulare sigură pentru cercetările de inginerie genetică, care să asigure protecția personalului de lucru al laboratorului, a publicului, cît și a mediului înconjurător față de agenții patogeni, de orice risc de contaminare cu agenți cu care se operează. În funcție de gradul de periculozitate pe care îl implică cercetările, condiționat de materialele cu care se lucrează, s-au stabilit

diferite tipuri de laboratoare pe care le vom descrie după ce vom reda, mai întîi principalele restricții generale, care se impun în astfel de cercetări.

XI.1. Măsuri generale de protecție

Foarte recent, au apărut sub auspiciile Academiei de Științe a U.R.S.S. „Principiile călăuzitoare provizorii în manipulările DNA recombinant" *, document care a fost întocmit pe baza unor materiale asemănătoare, apărute în S.U.A. (N.I.H.-Guidelines), Anglia, Franța și Olanda, precum și pe baza altor rapoarte și publicații, ocupîndu-se cu potențialul de hazard al DNA recombinant. Documentul acesta a fost redactat cu doi ani mai tîrziu decît N.I.H.-Guidelines (iunie 1976), iar în plus însumează și ține cont și de recomandările altor foruri științifice naționale și internaționale, motiv pentru care vom reda principalele norme prescrise pentru protecția generală.

Primul principiu general al măsurilor de protecție constă în respectarea cu strictețe a recomandărilor și a tehnicilor stabilite de protecția microbiologică. În conformitate cu acest principiu sînt acceptate să lucreze cu DNA recombinant numai acele persoane care au o pregătire medicală, au fost inițiate și instruite în tehnicile aseptice și în biologia generală a microorganismelor, astfel încît înțeleg și pot evalua potențialul biohazardului. Această instruire trebuie să fie dovedită printr-un certificat.

În continuare se recomandă respectarea strictă a următoarelor măsuri de securitate:

1) în timp ce se efectuează un experiment ușile laboratorului trebuie păstrate închise;

2) personalul trebuie să poarte uniforme speciale;

3) este interzisă păstrarea atît a hranei, cît și a băuturii în acest laborator;

4) se vor utiliza dispozitive mecanice pentru pipetarea probelor de cultură;

5) rezidiile solide și lichide, conținînd DNA recombinant, sau cele care au fost în contact cu el, vor fi plasate în containere speciale și apoi decontaminate;

6) animalele neîntrebuințate în experiențe vor trebui îndepărtate din laborator;

---

* „Provisional Guidelines on recombinant DNA manipulation", U.S.S.R. Academy of Sciences, Moscow, 1978.

7) suprafețele potențial contaminate vor fi decontaminate cu un dezinfectant la terminarea programului de zi și imediat în cazuri de urgență, după o răspîndire accidentală a DNA recombinant;

8) camerele vor fi ferite de insecte și rozătoare.

XI.2. Protecția biologică

Cercetătorul poate și chiar este obligat de normele de securitate a muncii să micșoreze considerabil potențialul de biohazard al lucrărilor sale cu DNA recombinant, prin alegerea atît a vectorilor (plasmide, bacteriofagi, virusuri), cît și a celulelor-gazdă adecvate și de tip inofensiv. Prin vectori și celule-gazdă inofensive se înțeleg acei vectori sau celule ale căror proprietăți îi determină să nu poată supraviețui și disemina în mediul înconjurător sau care nu posedă nișă ecologică în om, animale și plante, într-o anumită zonă geografică.

În momentul de față, tulpina de *Escherichia coli K12* este considerată a fi bacteria care oferă maximum de securitate pentru cercetările de DNA recombinant. De foarte mulți ani ea este minuțios studiată și în consecință proprietățile ei biologice (la fel și structura ei genetică) sînt mai bine cunoscute decît cele ale oricărui alt microorganism. Această bacterie nu colonizează în mod uzual intestinul normal și, ca atare, este puțin probabil ca ea să fie convertită într-o formă patogenă prin manipulările efectuate cu DNA recombinant, motiv pentru care se recomandă folosirea ei în astfel de cercetări.

Un alt sistem gazdă-vector, care în ultimul timp cîștigă din ce în ce mai mult atenția cercetătorilor, este forma asporogenă de *Bacillus subtilis* care, de asemenea, nu are nișă ecologică la om.

XI.2.1. Diferitele nivele de protecție biologică

Normele existente de protecție biologică recomandă trei nivele diferite de protecție.

Primul nivel este denumit B_1 (de la cuvîntul englezesc *biological)* sau HV_1 *(host-vector)* sau *EK1 (E. coli K)*. Acesta presupune utilizarea tulpinii standard de *E. coli K12*, respectîndu-se normele de protecție obișnuite dintr-un laborator cu o bună practică în manipularea materialului microbiologic.

Al doilea nivel, denumit pe scurt B_2 sau HV_2 sau *EK2*, se referă la obligaţia de a folosi tulpina *K12* „mutilată" *(crippled)* genetic, astfel încît cultivarea ei este posibilă numai în condiţii special create în laborator. Supravieţuirea ei în afara laboratorului este considerată esenţial imposibilă.

Al treilea nivel de protecţie *(B_3, HV_3, EK3)* este rezervat cercetărilor de tip B_2 care sînt efectuate pe animale şi/sau în nişa lor ecologică naturală.

XI.3. Protecţia fizică

Pentru a asigura o protecţie a personalului, publicului şi a mediului înconjurător, cercetările cu DNA recombinant se desfăşoară în mod obligatoriu cu tehnici şi instalaţii speciale. Totodată, întreg personalul trebuie să fie astfel instruit încît să poată folosi toate dispozitivele, în orice situaţie. În scopul îmbunătăţirii protecţiei fizice se recomandă automatizarea lucrărilor experimentale.

Liniile directoare de cercetare a DNA recombinant, trasate de Institutul Naţional de Sănătate a Statelor Unite (N.I.H.), Raportul Partidului Laburist din Anglia asupra „Practicii Manipulărilor Genetice", recomandările Academiei de Ştiinţe a U.R.S.S., precum şi recomandările Fundaţiei Europene de Ştiinţe, prevăd patru nivele de protecţie fizică *(P)*. Canada, spre deosebire de aceste organisme, recomandă chiar şase nivele de protecţie fizică. În cele ce urmează vom prezenta, în mod succint, în ce constau cele patru nivele de protecţie fizică.

Primul nivel (minimal) — P_1. Cercetările care se desfăşoară la nivelul de protecţie P_1 nu au nevoie de amenajări speciale, în afara celor necesare unui laborator obişnuit de microbiologie. În acest caz, laboratorul nu este separat de celelalte încăperi prin dispozitive de filtrare, comunicare sau ventilare. Accesul în laborator este permis chiar şi altor persoane, care nu lucrează în această unitate.

Al doilea nivel (scăzut) — P_2. În linii mari, laboratorul de tip P_2 este construit după un model asemănător cu cel al laboratorului de tip P_1. Spre deosebire însă de acesta din urmă, accesul în laboratorul P_2 este limitat şi, în plus, el trebuie să conţină unele dispozitive suplimentare, care să împiedice răspîndirea aerosolilor în mediul înconjurător. Cu toate că, practic, P_2 nu presupune existenţa în laborator a unui echipament de filtrare a aerului, de ventilaţie şi sterilizare cu ultraviolete a materialului biologic, se recomandă ca unele operaţii să se desfă-

șoare în cabinete de protecție biologică, echipate cu presiune de aer negativă, care să reducă la minimum posibilitatea răspîndirii materialelor conținînd DNA recombinant. În localul în care se găsește laboratorul de tip P_2 trebuie să existe și o autoclavă.

Al treilea nivel (moderat) — P_3. Cercetările care se desfășoară la nivelul al treilea de protecție fizică presupun existența unui laborator special construit în acest scop, care să fie separat de celelalte arii ale clădirii prin uși sigilate. Pereții, tavanul și pardoseala trebuie să fie ușor de spălat, iar în aria laboratorului să existe o autoclavă. În interiorul laboratorului trebuie să existe presiune de aer negativă, iar aerul din încăpere să fie trecut, în mod obligatoriu, printr-un sistem de ventilație cu filtre speciale, pentru a-l purifica înainte de a-l îndepărta în mediu.

Laboratorul impune, de asemenea, respectarea de către personalul propriu a unor măsuri speciale de decontaminare și igienă, o îmbrăcăminte de protecție specială, afișarea pe ușa laboratorului a simbolului universal de biohazard, pătrunderea în încăpere numai a persoanelor autorizate, precum și multe alte obligații.

Al patrulea nivel (înalt) — P_4. În acest caz este vorba de un laborator special construit, care este astfel proiectat încît exclude posibilitatea microorganismelor cu potențial patogen pentru om, animale și plante să poată scăpa din încăpere.

Un astfel de laborator este situat sau într-o clădire separată sau într-un compartiment al clădirii principale, care este total izolat de celelalte arii ale clădirii.

Pereții, plafonul și pardoseala sînt monolitice. Un sistem separat de ventilație menține o presiune de aer negativă în laborator, iar aerul este decontaminat înainte de evacuare. Ușile sînt comandate mecanic sau electromecanic, astfel încît să nu se deschidă simultan. Experiențele se desfășoară în cabinete ermetice, prevăzute cu sisteme de ventilație și filtrare a aerului, iar accesul în cabinete se face numai prin interiorul laboratorului.

Se asigură de asemenea ca intrarea și ieșirea personalului din unitate să se facă printr-un coridor „tampon", special, care să comunice atît cu laboratorul cît și cu camerele speciale de schimbare a materialului de protecție.

În tabelul 18 redăm cîteva exemple privind condițiile de protecție fizică și biologică impuse de normele prescrise de „Liniile directoare" pentru cercetările cu DNA recombinant, recomandate de Institutul Național de Sănătate al Statelor Unite (N.I.H. — Guidelines).

Cîteva exemple de protecție fizică și biologică în cercetările cu DNA recombinant, impuse de normele americane în vigoare

		Protecția biologică (numai pentru sistemul *E. coli*-gazdă)		
		EK1	*EK2*	*EK3*
Protecția fizică	P_1	– DNA din procariote nepatogene, care schimbă în mod natural gene cu *E. coli*. – DNA din plasmide sau bacteriofagi izolați din celule care schimbă în mod natural gene cu *E. coli*. Dacă genomul plasmidei sau bacteriofagului conține gene periculoase sau dacă segmentul de DNA are o puritate mai mică de 99% și nu este caracterizat se impune un grad superior de protecție.		
	P_2	– DNA din celule embrionare sau linii germinative aparținînd vertebratelor cu sînge rece. – DNA din alte animale cu sînge rece și eucariote inferioare (exceptînd insecte menținute în laborator pentru o perioadă mai mică de 10 generații). – DNA din plante (exceptînd plantele care conțin patogeni cunoscuți sau care produc toxine cunoscute) – DNA din procariote cu risc scăzut patogen, care schimbă natural gene cu *E. coli* – DNA din organelele din eucariote. Pentru un DNA din organele, care este mai puțin de 99% pur, sînt necesare grade superioare de protecție.	– DNA din vertebrate cu sînge rece neembrionare – DNA din procariote cu patogenicitate moderată, care schimbă în mod natural gene cu *E. coli*. – DNA din procariote nepatogene, care nu schimbă în mod natural gene cu *E. coli* – DNA din virusurile plantelor – DNA din organelele primatelor (pentru DNA din organele, care este mai puțin pur de 99%, sînt necesare grade superioare de protecție) – DNA din plasmide sau bacteriofagi, din celule-gazdă care nu schimbă natural gene cu *E. coli*. Dacă există un risc ca recombinantul să mărească patogenicitatea sau potențialul ecologic al gazdei sînt necesare grade superioare de protecție.	

Tabelul 18 (continuare)

		Protecția biologică (numai pentru sistemul *E. coli*-gazdă)		
		EK1	*EK2*	*EK3*
Protecția fizică	P_4	— DNA din procariote nepatogene, care nu schimbă natural gene cu *E. coli* — DNA din virusurile plantelor — DNA din plasmide sau bacteriofagi din celule-gazdă care nu schimbă natural gene cu *E. coli*. Dacă există riscul ca recombinantul să mărească patogenicitatea sau potențialul ecologic al gazdei sînt necesare grade superioare de protecție.	— DNA din linii celulare germinative sau țesuturi primare embrionare — DNA din alte celule de mamifere — DNA din păsări — DNA din embrioni sau neembrionar din linii celulare germinative de vertebrate (dacă vertebratele produc o toxină) — DNA din procariote cu risc patogenic moderat, care nu schimbă natural gene cu *E. coli* — DNA din virusurile animalelor (dacă DNA clonat nu conține gene periculoase)	— DNA din țesuturi primare neembrionare — DNA din virusuri animale (dacă DNA clonat conține gene periculoase)
	P_3		— DNA din țesuturi primare neembrionare — DNA din virusuri animale (dacă după clonare nu conține gene periculoase)	

Bibliografie

1. *N.I.H.—Guidelines Research Involving Recombinant DNA Molecules* June (1976), U.S. Goverment Printing Office, Washington (D.C.).
2. *Grobstein C. The Recombinant DNA Debate*, Scientific American, 22, 237 (1977).
3. *Recomandările Fundației Europene de Știință privind cercetările cu DNA recombinant* (26 oct. 1976).
4. *Recombinant DNA Research*: *Survey of International Activities* (1978).
5. *Provisional Guidelines on Recombinant DNA Manipulation*, Academia de științe a U.R.S.S., Moscova (1978).

APENDIX

Principalele metode utilizate pentru construirea moleculelor de DNA recombinant

Cultivarea bacteriilor purtătoare de plasmide (după Colman şi colab., 1978); Popa şi colab. (1980).

Metoda rapidă şi directă de identificare a DNA plasmidic în bacterii (după Eckhardt, 1978).

Metode de izolare şi purificare a principalelor vehicule:

— Metoda de izolare a DNA plasmidic (după Bazaral şi Helinski, 1968)

— Metoda generală de izolare a DNA plasmidic (după Guerry, Le Blanc şi Falkow, 1973).

— Purificarea rapidă a DNA plasmidic prin cromatografie pe hidroxiapatită (după Colman şi colab., 1978).

— Extracţia DNA plasmidic (după Popa şi colab., 1980).

— Metoda de extracţie şi purificare a DNA din virusul SV40 (după Sol şi colab., 1975).

Metode de izolare şi purificare a enzimelor de restricţie:

— Metoda de purificare a enzimei de restricţie Eco*R*I (după Yoshimori, 1973).

— Metoda generală pentru izolarea şi purificarea enzimelor de restricţie (după Greene şi colab., 1978).

Metoda de purificare şi testare a ligazei *T4* necesară construirii de molecule de DNA recombinant (după Moore şi James, 1976).

Transformarea celulelor de *E. coli* K12 cu DNA plasmidic (după Berg şi colab., 1976).

Metode de construire a moleculelor de DNA recombinant:

— Metoda generală de construire a unor DNA recombinanţi (după Clarke şi Carbon, 1975).

— Metodă de construire a unui DNA recombinant conţinînd gena pentru sinteza somatostatinei (după Itakura şi colab., 1977).

Cultivarea bacteriilor purtătoare de plasmide (după Colman şi colab., 1978)

Materiale şi metode.

Tulpini bacteriene şi plasmide folosite. S-au folosit tulpinile bacteriene şi plasmidele date în tabelul 19.

Tabelul 19

Tulpini bacteriene și plasmide

Tulpină *E. coli*	Plasmidă	Masă moleculară $\cdot 10^{-6}$
581 (thy$^-$, str^R)	*Col E_1*	4,5
OS410 (str^R, thi$^-$)	362	3,1
OS410 (str^R, thi$^-$)	*Col E_1*::Tn7	13,8
SPA-0	V—	—
C61127 (trp^p, BI, str^S)	*pML21*	7,9
HB101	*pX1r101*	10,4
HB101	*pX1108*	12,7
HB101	*pX1212*	11,5

Creșterea bacteriilor. Din fiecare tulpină menționată în tabel iexcepție făcînd cele *HB101*), cultivată pe plăci de agar, s-au desprins colonii cu care s-au inoculat 10 ml bulion nutritiv; creșterea a avut loc peste noapte la 37°C. Fiecare cultură s-a folosit ulterior pentru inocularea a 1 litru bulion *L* sau bulion *M-9*, (*Horiuchi, Ohishimo*-1966) suplimentate cu 1% „casamino acids" (Difco Ltd.) și 2% glucoză (pentru tulpina *581*, în cursul cultivării, s-au adăugat și 20 µg timină/ml). Creșterea s-a făcut la 37°C, la o densitate optică la 260 nm de 0,6, adică o densitate de 3.10^8 celule/ml. S-a adăugat apoi cloramfenicol la o concentrație finală de 100 µg/ml, iar incubația a mai continuat încă 20 ore. Dacă este necesară obținerea de DNA plasmidial marcat cu ^{3}H-timidină, la mediu s-a adăugat ^{3}H-timidină 500 µCi/l și 2-deoxiadenozină 2 mg/ml, odată cu cloramfenicolul. Plasmidele *pX1212*, *pX1108* și *X1r101* conțin inserții de DNA ribozomal de *Xenopus laevis*. Din bacteriile astfel obținute se izolează DNA plasmidic după tehnica lui Clewell și Helinski (1969).

Cultivarea bacteriilor purtătoare de plasmide pBR322 și pBR313
(după Popa și colab., 1980)

Medii de cultură și chimicale:

1. Bulion cu peptonă din cazeină și peptonă din făină de soia, (Merck); 30 g/l.

Compoziție:
— peptonă din cazeină .... 17,0 g/l
— peptonă din făină de soia .... 3,0 g/l
D— (+) glucoză .... 2,5 g/l
— clorură de sodiu .... 5,0 g/l
— fosfat acid de potasiu .... 2,5 g/l
La acest bulion se adaugă 5% T.C. Yeastolato Difco.

2. Mediu cu agar pentru determinarea numărului de germeni, (Merck); 35 g/l.

Compoziție:
— extract de carne.. 3,0 g/l
— extract de drojdie .... 5,0 g/l
— peptonă din cazeină .... 15,0 g/l
— D(+) glucoză .... 1,0 g/l
— agar-agar .... 11,0 g/l

3. Ampicilină (în capsule);
4. Tetraciclină (în capsule); Intreprinderea de medicamente București
5. Cloramfenicol (în capsule).

Tulpini de E. coli și plasmide utilizate:

Tulpina PRC = 401 purtătoare a plasmidei *pBR313*;
Tulpina PRC = 400 purtătoare a plasmidei *pBR322*;
Tulpina PRC = 399 de control (fără plasmidă).

Aceste tulpini au fost oferite prin amabilitate de Dr. E. Lederberg (Plasmid Reference Center, Stanford, California, U.S.A.).

Creșterea bacteriei.

În prima zi, bacteria se inoculează în 2 ml mediu nr. 1 și se păstrează peste noapte la 37°C. A doua zi, o parte din bacteria care a crescut în cei 2 ml mediu nr. 1, servește ca inocul pentru mediul nr 2, turnat pe o placă Petri, mediu la care s-a adăugat antibioticul respectiv: ampicilină 50 μg/ml pentru tulpina PRC ≠ 401 cu plasmida *pBR313*; ampicilină 50 μg/ml și tetraciclină 20 μg/ml pentru tulpina PRC ≠ 400 cu plasmida *pBR322*. Se lasă peste noapte la 37°C. A treia zi, se ia cîte o colonie și se inoculează în 10 ml mediu nr. 1. Incubația se face peste noapte la 37°C. A patra zi, mediul în care s-a dezvoltat bacteria, servește ca inocul în proporție de 1/100 sau 1/50, pentru amplificarea bacteriei în 400 pînă la 1000 ml de mediu nr. 1. Menționăm că agitarea culturii timp de 5 ore la 37°C favorizează multiplicarea bacteriei. Cînd turbiditatea mediului a atins valoarea de A_{260} nm 0,8 se adaugă cloramfenicol 180 μg/ml și se lasă peste noapte la 37°C, agitîndu-se în continuare. A cincea zi, bacteria se separă prin centrifugare (1 oră la 3 000 t/min).

Metoda rapidă și directă de identificare a DNA plasmidic în bacterii (după Eckhardt, 1978)

Principiul metodei. Bacteriile purtătoare de plasmide sînt transformate în sferoplaști sub acțiunea lizozimului, iar sferoplaștii rezultați sînt lizați cu dodecilsulfat de sodiu (DDS), direct în gelul pentru electroforeză. Din lizatul obținut se separă apoi DNA plasmidic de DNA cromozomal sub acțiunea curentului electric.

Metoda este foarte sensibilă și rapidă. Ea se poate folosi pentru analiza unei singure colonii de celule.

Metoda de lucru. Liza bacteriilor gram-negative (de ex. *E. coli*) diferă întrucîtva de liza bacteriilor gram-pozitive (de ex. *B. subtilis*), motiv pentru care se prepară amestecuri diferite în cele două cazuri.

a) Amestecul cu lizozim pentru bacterii gram-negative:

— lizozim (Calbiochem, 7500 U/ml).
— RNază I (Worthington, 0,3 U/ml)
— BFA 0,05% în tampon TEB (Tris 89 mM — EDTA. Na_2 12,5 mM — H_3BO_3 8,9 mM *p*H = 8,2)
— Ficoll 400 000. 20% (Sigma)

RNaza se dizolvă inițial în CH_3COONa 0,4 M *p*H = 4 la o concentrație de 10 mg/ml, și apoi se încălzește 2 min la 98°C, înainte de a dilua în amestecul cu lizozim.

b) Amestecul cu lizozim pentru bacterii gram-pozitive:

— lizozim (75 000 U/ml)
— EDTA.Na_2 50 mM *p*H = 8,0
— NaCl 0,1 M

c) Amestecul cu DDS pentru bacterii gram-negative:

— DDS 0,2% în Tris 89 mM-EDTA. Na_2 2,5 mM—H_3BO_3 8,9 mM *p*H = 8,2
— Ficoll 400 000 10%

d) Amestecul cu DDS pentru bacterii gram-pozitive:

— DDS 2% în tampon TEB (v. mai sus)
— Ficoll 400.000 10%.

e) Procedeul de electroforeză. Se lucrează cu un aparat de electroforeză cu migrare verticală. Dimensiunile gelului sînt: 110 × 140 × 2,5 mm, iar dimensiunile godeului de 6,5 × 15 × 2,5 mm. Tamponul: Tris 89 mM — EDTA.Na_2 2,4 mM—H_3BO_3 8,9 mM $pH = 8,2$; concentrația agarozei 0,75—1,2%;

f) Încărcarea și liza: ca sursă de DNA plasmidic se folosesc fie colonii unice de pe plăcile Petri (de 24—72 ore), fie lichidele de cultură;

1) 1—2 colonii (10^7—10^8 celule) se iau de pe placă și se amestecă cu grijă în godeul plăcii de agaroză cu 15 μl lizozim. Suspensia devine turbidă ușor. Bacteriile gram-negative se lasă 2—5 min la temperatura camerei, iar cele gram-pozitive 30—40 min;

2) deasupra stratului precedent se așează cu grijă 30 μg DDS și se face apoi o foarte ușoară amestecare, așa încît straturile să nu dispară, ci să rămînă limita lor de separare;

3) se mai adaugă 100 μl soluție Ficoll 400.000 10% fără a deranja stratul viscos de DNA, care s-a format;

4) godeurile se închid cu agaroză (0,50%), apoi se pune tamponul în bac;

g) Separarea electroforetică: DNA plasmidic se supune electroforezei 60 min la 20 mA, și apoi 60—150 min la 40 mA (în funcție de masa moleculară a DNA plasmidic);

h) Examinarea DNA. După terminarea electroforezei, gelul se introduce într-o soluție de bromură de etidiu 0,4 μg/ml timp de 15 min, după care se examinează în ultraviolet folosind filtre adecvate. Spoturile de DNA apar colorate în roșu, datorită complexului care se formează între DNA și bromura de etidiu.

i) Recomandări. În etapa 1) este important ca gelul să nu fie supraîncărcat cu celule. În etapa 2) se va evita amestecarea completă pentru a obține randamentul maxim de DNA plasmidic; în acest caz se produce o liză celulară parțială, care va fi completată în cursul electroforezei de migrarea DDS.

Varianta pentru DNA plasmidic din Staphilococcus aureus

Întrucît *Staphilococcus aureus* este rezistent la acțiunea lizozimului, în acest caz transformarea celulelor sale în sferoplaști se face sub acțiunea lysostophinei.

— cultura de peste noapte pe mediu solid a tulpinii *S. aureus* de studiat se produce pe același mediu și se incubează 4 ore la 37°C.

— cultura se suspendă în 5 ml tampon TES cu 25% sucroză, la o densitate de aproximativ 5 × 10^8 celule/ml;

— se centrifughează 1,5 ml suspensie. Sedimentul se reia în 0,1 mg/ml lysostaphin. Incubare: 1 oră la 37°C.

— se adaugă 0,1 ml soluție 2% DDS pentru liza sferoplaștilor;

— se agită violent (Vortex) timp de 1,5 min pentru ruperea DNA cromozomal;

— se încarcă 35—50 μl din lizatul obținut per godeu în strat de agaroză 0,8% în tampon TEB (Tris 8,9 mM, EDTA 2,5 mM, acid boric 89 mM, $pH = 8,3$);

— se aplică tensiunea de 250 V pentru 16 ore;

— după debranșarea curentului, stratul de agaroză se scoate din aparatul de electroforeză și se pune într-un litru de apă distilată la care s-a adăugat 0,1 ml soluție bromură de etidiu 10 mg/ml; se ține 20 min;

— se trece stratul de agaroză în baie cu apă distilată pentru îndepărtarea excesului de bromură de etidiu și se menține pentru alte 20 min;

— se examinează stratul de agaroză prin transluminare cu lumină ultravioletă. Benzile DNA, datorită fixării bromurii de etidiu, apar colorate în roșu. Se fotografiază folosind filtre adecvate.

Metode de izolare și purificare a principalelor vehicule

Metoda de izolare și purificare a DNA plasmidic
(după Bazaral și Helinski, 1968)

Se prepară o cultură bacteriană de 10—15 ml cu $< 10^9$ celule/ml, marcate cu radioizotopi. Se spală apoi prin centrifugare de 2 ori cu tampon TES (NaCl 0,05 M, Tris 0,050 M, EDTA 0,005 M, *p*H 8,0), la 0°C. Sedimentul se resuspendă în 1 ml de amestec cu lizozim 1 mg — RNază 500 µg — sucroză 100 mg în tampon TES, apoi se incubează 10 min la 37°C. Suspensia rezultată se răcește 10 min pe baie de gheață, iar în continuare se adaugă 0,5 ml de sarcozil 2% în apă. Se lasă la temperatura camerei și se amestecă prin aspirare-respingere prin pipetă. Se mai adaugă 1 ml tampon TES la temperatura camerei și se continuă aspirarea-respingerea cu o viteză de 0,3 ml/sec. Lizatul astfel tratat cu cromozomul rupt („sheared") 2 ml se pune într-un tub cu 13,1 g CsCl, 4 ml bromură de etidiu (700 µg/ml în tampon fosfat sodic 0,1 M *p*H 7,0) și 7,6 ml apă. Conținutul tubului se omogenizează și se centrifughează 44 ore la 44 000 rpm, la 20°C (Ti60 unghiular). În urma centrifugării, DNA plasmidic se separă sub forma unei benzi ușor de localizat în lumină ultravioletă. DNA se extrage din tub printr-o puncție laterală efectuată cu o seringă. DNA-ul astfel obținut se dializează și la nevoie se precipită cu alcool etilic pentru concentrare.

Metoda generală de izolare a DNA plasmidic
(după Guerry, Le Blanc și Falkow, 1973)

Metoda se aplică la izolarea plasmidelor cu masa moleculară cuprinsă între $5,4 \times 10^6$ și 65×10^6 daltoni. Tulpinile de *E. coli K12* conținînd plasmide de mase moleculare în domeniul menționat sînt crescute pînă la faza logaritmică în 30 ml mediu salin minimal suplimentat cu 0,5 µg timină/ml, 250 µg deoxiadenozină/ml 3 µg ^{3}H-timină/ml (cu 20 Ci/mM). Celulele se recoltează prin centrifugare și se suspendă într-un ml de sucroză 25% în tampon Tris 0,05 M *p*H 8,0. După adăugarea a 0,2 ml lizozim (5 ml/ml în tampon Tris 0,25 M *p*H 8,0) suspensia se lasă 5 min pe baie de gheață, iar apoi se adaugă 0,4 ml EDTA 0,25 M *p*H 8,0, continuîndu-se răcirea încă 5 min. Liza celulară completă se realizează prin adăugare de DDS la o concentrație finală 1%. Soluției vîscoase rezultate i se adaugă NaCl 5 M pentru a avea concentrația finală de 1 M, se agită cu blîndețe și apoi se lasă peste noapte. Pentru îndepărtarea — practic — a întregii cantități de DNA cromozomal (99%) se face o centrifugare de 30 min la 17 000 xg, la rece, în urma căreia DNA plasmidic rămîne în supernatant, iar DNA cromozomal sedimentează.

Metoda prezintă o serie de avantaje: nu este necesar ca plasmida să fie în forma *CCI*, pe de o parte, iar pe de altă parte este aplicabilă unor plasmide cu un domeniu larg de masă moleculară.

Purificarea rapidă a DNA plasmidic prin cromatografie pe hidroxiapatită (după Colman și colab., 1978)

Colman și colab. au descris un procedeu de purificare a DNA plasmidic, care nu utilizează centrifugarea în CsCl și care în plus, este rapid, ieftin și permite obținerea de DNA de înaltă puritate. Principiul de bază constă în reținerea selectivă și reversibilă, pe coloană de hidroxiapatită, a unor molecule mici de DNA dublu catenar, în condiții care nu permit nici legarea vreunei specii de RNA, și nici legarea proteinelor.

Prepararea lizatului clar. Bacteriile obținute prin metoda descrisă anterior s-au recoltat prin centrifugare, timp de 30 min, la 2 500 rpm, la 4°C, a unui litru de cultură. Fiecare sediment bacterian s-a reluat în 4 ml sucroză 0,25 M cu $MgCl_2$ 2 mM,

iar lizatul clar s-a obţinut prin metoda lui Clewell şi Helinski: sedimentul resuspendat ca mai sus a fost incubat succesiv cu 0,8 ml de soluţie de lizozim 20 mg/ml în tampon Tris 10 mM — HCl *p*H 8,0, timp de 5 min la 0°C, iar apoi cu 1,6 ml EDTA 0,25 M *p*H 8,0 încă 5 min la 0°C şi final cu 6,4 ml Triton X-100 0,5% (g/v) în tampon Tris 50 mM—HCl *p*H 8,0 cu EDTA 0,0625 M timp de 20 min la 0°C. Probele s-au agitat uşor din 5 în 5 min. În unele cazuri, concentraţia de EDTA poate varia în limitele 10—40 mM.

Cromatografia pe hidroxiapatită. Pentru cromatografia pe hidroxiapatită s-a folosit metoda descrisă de Britten şi colab., care permite separarea DNA dintr-un amestec cu RNA şi proteine. Pulberea de hidroxiapatită (Biorad, DNA grade) a fost suspendată în uree 8 M, în tampon fosfat sodic 0,24 M *p*H 6,8; s-a folosit cîte 1 g hidroxiapatită pentru fiecare litru de cultură bacteriană. Suspensia a fost turnată într-o coloană de sticlă cu diametrul de 3 cm şi s-a spălat cu două volume de uree 8 M în tampon fosfat sodic 0,24 M *p*H 6,8. Atît această etapă, cît şi următoarele, se execută cu presiune pozitivă. 1,1 volume lizat clar s-au diluat cu 8,9 volume de uree 9 M în tampon fosfat 0,27 M cu DDS 0,9% *p*H 6,8, iar apoi proba s-a aplicat pe coloana de hidroxiapatită. Coloana s-a spălat cu uree 8 M în tampon fosfat sodic 0,24 M *p*H 6,8, pînă cînd E_{260} a fost practic 0. Prin coloană s-au mai trecut de 3 ori cîte două volume tampon fosfat 0,01 M *p*H 6,8. Adăugarea de tampon fosfat 0,3 M *p*H 6,8 a dus la eluarea DNA plasmidic. Recuperarea DNA se poate urmări spectrofotometric sau prin metoda cu difenilamină a lui Burton. Şarjele de hidroxiapatită diferă foarte mult între ele, iar randamentul de obţinere a DNA plasmidic variază între 0,6 şi 5 mg.

Centrifugarea în gradient de densitate, în prezenţa bromurii de etidiu. Lizatele clare s-au pregătit pentru ultracentrifugarea în gradient de densitate prin adăugare de 1 g CsCl şi a 0,1 ml bromură de etidiu (10 mg/ml) pentru fiecare ml de lizat. Soluţiile au fost ultracentrifugate 48 pînă la 60 ore la 40 000 rpm la 20°C în centrifugă MSE cu rotor angular 8×50 ml. După ultracentrifugare, banda fluorescentă mai densă care conţine *CCI* DNA s-a recoltat, iar colorantul s-a îndepărtat prin extracţii succesive cu alcool izoamilic saturat cu CsCl. Ulterior s-a procedat la dializa fracţiunilor contra tampon Tris 10 mM —NaCl 10 mM — EDTA 1 mM *p*H 7,6.

Gel electroforeza. Analiza DNA a fost făcută pe gel de agaroză 0,8% (Sigma tip II), pe placă cu dimensiunile 20 × 15 ×0,4 cm. Tamponul utilizat a fost Tris 18 mM — H_3BO_3 18 mM — EDTA 3 mM *p*H 8,3 sau Tris 40 mM — acetat de sodiu 20 mM —EDTA 2 mM *p*H 8,3. Electroforeza s-a făcut la 120 V timp de 2 ore sau la 30 V timp de 15 ore. După terminarea electroforezei gelurile s-au îmbibat prin păstrare într-o soluţie de bromură de etidiu 0,5 µg/ml, în tampon de electroforeză şi au fost analizate în lumină UV, pentru punerea în evidenţă a benzilor.

Extracţia DNA plasmidic (după Popa şi colab., 1980)

Pentru a evita, pe de o parte, centrifugarea în gradient de clorură de cesiu recomandată de metodele clasice, iar pe de altă parte, colmatarea coloanei de hidroxiapatită de către DNA cromozomal, care uneori deranjează serios separarea DNA plasmidic în cazul utilizării metodei lui Colman şi colab. (1978), s-a propus următoarea variantă de separare a DNA plasmidic *pBR322* şi *pBR313*.

Ea are două etape principale: *a*) obţinerea lizatului clar; b) cromatografia pe coloană de hidroxiapatită a lizatului clar.

a) Lizatul clar s-a obţinut prin metoda Clewell şi Helinski (1969) modificată astfel: celulele rezultate dintr-o cultură de 400 ml s-au suspendat în 2 ml de zaharoză 25% în Tris/HCl 0,25 M *p*H 8. Apoi, au fost incubate cu 1,0 ml de lizozim (20 mg/ml) în Tris/HCl 0,25 M *p*H 8 timp de 5 min la 0°C; apoi cu 2,6 ml de EDTA 0,25 M *p*H 8 tot 5 min la 0°C şi final cu un volum egal de Triton X-100 2,0% (g/v) în Tris/HCl 5 mM, EDTA 2,5 mM, *p*H 8 timp de 20 min la 0°C. Amestecul a fost centrifugat timp de 60 min la 25 000 rpm cu rotor SW 50.1.

b) Cromatografia pe coloană de hidroxiapatită. Supernatantul obţinut prin centrifugare a fost supus cromatografiei pe coloană de hidroxiapatită, preparată după metoda lui Tisselius şi colab. (1956). Coloana a avut diametrul de 1,4 cm şi a conţinut 1 ml de suspensie de hidroxiapatită (echivalentul a 0,1 g substanţă uscată) pentru 3 ml de supernatant.

Eluţia s-a făcut discontinuu cu tampon fosfat de diferite molarităţi. Trecerea la molaritatea superioară s-a făcut în momentul în care transmisia la 280 nm a soluţiei eluate de pe coloană a atins valoarea maximă. S-a ales transmisia la 280 nm pentru a urmări îndepărtarea Tritonului X-100, cu maxim de sensibilitate.

În final, identificarea DNA plasmidic s-a făcut prin electroforeză în gel de agaroză. Maximul de eluţie a DNA plasmidic s-a obţinut la concentraţia de fosfat 0,2 M.

Metoda de extracţie şi purificare a DNA din virusul SV40
(după Sol şi colab., 1975)

Monostratul de celule *BSC-1* infectate cu virus SV40 se desprinde de pe sticlă prin îngheţ-dezgheţ. Virusul şi celulele se depun prin centrifugare cu rotor SW27 într-o ultracentrifugă Beckman la 27 000 rpm timp de 2 ore la 4°C. DNA viral se extrage selectiv prin metoda Hirt (1967): sedimentul celular şi virusul se suspendă în EDTA sodic 10 mM *p*H 7,5, iar apoi se adaugă DDS la 0,6% şi NaCl la 1 M. Lizatul se lasă peste noapte la 4°C. Lichidul supernatant se amestecă cu CsCl la o densitate de 1,55 g/ml, şi se adaugă bromură de etidiu la o concentraţie finală de 300 μg/ml. Amestecul este supus ultracentrifugării în rotorul SW50 la 44 000 rpm, timp de 40 ore, la 20°C. Banda inferioară care se vede se recoltează prin puncţia laterală a tubului, iar bromura de etidiu se îndepărtează prin extracţie cu alcool izoamilic şi eter. După dializă contra tampon Tris 10 mM —HCl *p*H 7,5 cu EDTA. Na 1 mM, concentraţia DNA se determină spectrofotometric.

Metoda de purificare a enzimei de restricţie Eco RI
(după Yoshimori, 1973)

Purificare. Tulpina de *E. coli R.RI* se cultivă pînă în faza semilogaritmică, moment în care se recoltează celulele. Se resuspendă apoi în tampon PEM (fosfat de potasiu 0,01 M *p*H 7,0 EDTA 0,001 M şi 0,007 M β-mercaptoetanol) şi se sparg în prezenţa unor bile de sticlă cu un vibrator. Extractul celular se centrifughează la 30 000 rpm timp de 105 min la 4°C într-un rotor tip Spinco 30. Supernatantul se tratează cu sulfat de streptomicină 2,5%. Precipitatul obţinut se colectează prin centrifugare, iar supernatantul se ajustează la concentraţii de 50% sulfat de amoniu. Precipitatul rezultat se colectează prin centrifugare şi apoi se dizolvă în PEM căruia i s-a adăugat NaCl 0,2 M şi a fost corectat la *p*H 6,5. Soluţia se dializează faţă de PEM, *p*H 6,5 cu NaCl 0,2 M. Se pregăteşte o coloană de DEAE-celuloză care se echilibrează cu acelaşi tampon. Se introduce proba în coloană, iar eluţia se face cu un gradient de NaCl cuprins între 0,2 şi 0,75 M în tampon PEM *p*H 6,5. Fracţiunile eluate între 0,38 şi 0,48 M NaCl conţin enzima de restricţie. Ele sînt suficient de pure pentru a fragmenta specific DNA λ sau alţi DNA.

Metodă generală pentru izolarea şi purificarea enzimelor de restricţie (după Greene şi colab., 1978)

Recent Greene şi colab. au elaborat o metodă simplificată de purificare a enzimelor de restricţie. Ea a fost verificată pentru purificarea următoarelor enzime: Alu I, Bam I, Bgl I, Bgl II, Eco *R*I, Eco *R*II, Hae II, Hae III, Hga, Hin*c* III, Hpa I, Hpa II, Hsu I, Pst I, Sal I, Taq. Practic, aproape toate enzimele de restricţie pot fi purificate cu ajutorul acestei metode.

Enzimele astfel obținute au un grad ridicat de puritate și pot fi folosite pentru maparea fizică a DNA, determinări de secvențe de DNA și, ceea ce este extrem de important, în construcția de DNA recombinant. Este de notat că enzimele de restricție purificate sînt lipsite de alte nucleaze și fosfataze.

a) Tulpinile bacteriene și condițiile de creștere.

Datele sînt sintetizate în tabelul 20. Tulpinile de *Haemophilus* au fost cultivate într-un microfermentator tip New Brunswick 14 l în următorul mediu: 37 g Brain heart infusions (BHI), 0,2 ml soluție stoc NAD$^+$ și 10 ml soluție stoc hemină la litru. Soluția stoc de NAD$^+$ (10 mg/ml) a fost sterilizată prin filtrare și păstrată la −20°C. Soluția stoc de hemină (0,1% în 4% trietanolamină) a fost sterilizată 15 min la 65°C și s-a păstrat la 4°C. O cultură de 500 ml (rezultată prin inocularea unei singure colonii și crescută 16 ore) s-a folosit pentru însămînțarea a 12 l de mediu în microfermentator. Creșterea a continuat 5—7 ore la 37°C, cu o aerare de 11 l aer/min și amestecare de 3—500 rpm. Creșterea densității celulelor s-a măsurat cu un fotometru Klett-Summerson, cu filtru verde, iar celulele s-au recoltat prin centrifugare cînd densitatea lor a atins un platou (400—600 unități Klett).

Tabelul 20

Tulpinile bacteriene și condițiile lor de creștere

Enzima	Tulpina	Proveniența tulpinii*	Fermentator/ mediu	Randament
Alu I	*Arthrobacter luteus*	R.J. Roberts	Hi density/SLBH	280 g
Bam I	*Bacillus amyloliquefaciens H*	G. Wilson	Hi density/SLBH	55 g
Bgl I Bgl II	*Bacillus globigii*	G. Wilson	Hi density/SLBH	60 g
Eco *R*I	*Escherichia coli pMB4*	H.W. Boyer	Hi density/SLBH	250 g
Eco *R*II	*Escherichia coli RY22*	H.W. Boyer	Hi density/SLBH	250 g
Hae II Hae III	*Haemophilus aegyptius*	R.J. Roberts	Microferm/BHI	55 g
Hga	*Haemophilus gallinarum*	R.J. Roberts	Microferm/BHI	60 g
Hinc II	*Haemophilus influenzae c*	R.J. Roberts	Microferm/BHI	47 g
Hpa I Hpa II	*Haemophilus parainfluenzae*	H.W. Boyer	Microferm/BHI	60 g
Hsu	*Haemophilus suis*	R.J. Roberts	Microferm/BHI	25 g
Sal I	*Streptomyces albus*	—	Microferm/Zubay	—
Taq	*Thermophilus aquaticus*	R.J. Roberts	Microferm/Castenholtz	22 g

* Tulpinile cultivate în Hi density/SLBH pot fi obținute și în microfermentator în mediu Zubay sau în alte condiții similare, apropriate tulpinilor în cauză.

Streptomyces albus a fost cultivat tot în microfermentator New Brunswick în mediu Zubay, care conține: 28,9 g K_2HPO_4, 5,6 g KH_2PO_4, 10 g extract de drojdie, 10 mg vit. B_1 la litru și 1% glucoză (autoclavată separat). 11 l de mediu s-au inoculat cu 1 l de cultură (realizată de la o singură colonie, crescută 36 h la 37°C). Bacteria a fost recoltată după încă 36 h la 37°C.

Thermus aquaticus (extract de drojdie triptonat) a fost cultivat în microfermentator New Brunswick în mediu Castenholtz TYE (manual Bergey). Mediul s-a preparat prin amestecarea a 100 ml TYE 1% steril, 1 ml soluție „Nitsche trace element", 50 ml săruri Castenholtz A, 50 ml săruri Castenholtz B și 800 ml apă distilată. Soluția TYE 1% conține 10 g triptonă și 10 g extract de drojdie la 1 l apă distilată. Soluția „Nitsche trace element" conține: 0,5 ml H_2SO_4, 2,2 g $MnSO_4$, 0,5 g $ZnSO_4$, 0,5 g H_3BO_3, 0,016 g $CuSO_4$, 0,025 g Na_2MoO_2, 0,046 g $CaCl_2 \cdot 6H_2O$/1. Sărurile Castenholtz A conțin: 2,0 g acid nitriloacetic, 20 ml din $FeCl_3$ 0,03%, 1,2 g $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, 2,1 g KNO_3/1, iar sărurile Castenholtz B: 2,0 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,16 g NaCl, 14,0 g $NaNO_3$, 2,2 g Na_2HPO_4/1. Temperatura optimă de creștere pentru *Thermus aquaticus* este 70°C, dar microfermentatorul nu a permis decît 63°C·11 l de mediu s-au inoculat cu 1 l de cultură obținută prin incubare peste noapte la 70°C; creșterea s-a făcut 6 ore la 63°C.

Celelalte tulpini bacteriene au fost cultivate într-un fermentator de creștere intensă (Lab-line Instruments) la faza log tardivă, în mediu SLBH (11 g triptonă, 22,5 g extract de drojdie, 51 ml K_2HPO_4 1 M și 15,7 ml KH_2PO_4 1 m la litru +0,4% glicerol).

b) Activități enzimatice (testare).

Enzimele s-au testat prin electroforeza DNA hidrolizat, în agaroză 1% în tampon Tris-borat (10,8 g Tris bază, 0,93 g EDTA · Na_2, și 5,5 g H_3BO_3/1), timp de 1 1/4 ore la 16 v/cm.

Ca substrat se poate utiliza orice DNA cu un număr convenabil de situsuri de rupere. În general s-a folosit DNA plasmidic din *pBR322*, cu excepțiile prevăzute în tabelul 20. Pentru testarea Eco *R*II, DNA s-a preparat din *E. coli* tulpina *GM 31* (defectivă în DNA citozinmetilază = dem). Tamponul folosit pentru testarea diverselor enzime este dat în tabelul 21. Din cauza interferenței cu alte nucleaze, unele enzime nu au putut fi testate decît după faza de cromatografie pe fosfoceluloză (tabelul 20). Pentru toate — exceptînd — Eco *R*I — 0,5—2 µl din extract sau din eluatul de pe fosfoceluloză s-a incubat în 30 µl conținînd 0,2 µg DNA la 37°C (60°C pentru Taq) timp de 15—60 min. Eco *R*I este codificat în mai multe copii, de aceea necesită un volum mai mic de probă. Extractele brute și eluate de pe fosfoceluloză au fost diluate de cca 20 ori. Cantitățile de enzimă și timpii din tabelul 20 trebuie privite ca ghid orientativ.

c) Prepararea extractelor celulare.

Metoda de purificare este standardizată pentru 50 g celule. Sedimentele celulare bacteriene înghețate s-au decongelat și s-au suspendat în 200 ml tampon K_2HPO_4 10 mM—KH_2PO_4 *p*H = 7,0 cu β-mercaptoetanol 7 mM și EDTA 1 mM (EB=tampon de extracție), conținînd și fenilmetilsulfonilfluorură (PMSF) 25 µg/ml, NaN_3 1 mM și NaCl 0,4 M. Unele enzime s-au extras cu succes și în absența azidei și a inhibitorului proteolitic (PMSF), dar adăugarea lor este de dorit.

Suspensia celulară a fost sonicată cu un ultrasonicator Branson W-350 la turația maximă și folosind o tijă de 1 inch (2,4 cm). Ultrasonicarea s-a făcut în pulsuri de 30"—90", suspensia celulară fiind agitată pe gheață; temperatra s-a păstrat sub 10°C. Citeva dintre tulpinile bacteriene sînt rezistente la sonicare. Acestea s-au agitat pe gheață cu adăugare de 100 µg/ml lizozim cu 15—30 min înainte de ultrasonicare (tabel 20). Gradul de spargere a celulelor s-a urmărit prin creșterea absorbanței la 280 nm a unor alicote centrifugate din extract. În cazul Eco *R*I, eliberarea activității enzimatice are loc în paralel cu eliberarea materialului care absoarbe la 280 nm.

Suspensia celulară ultrasonicată s-a centrifugat 1 oră la 100 000 g (rotor Beckman 35). Supernatantul s-a decantat, conductibilitatea extractului s-a diluat la un echivalent de 0,2 M NaCl sau 0,1 M NaCl, în funcție de tulpină (tabelul 21), iar *p*H-ul s-a ajustat la 7,0. Extractul s-a aplicat direct pe coloana de fosfoceluloză.

d) Cromatografia pe fosfoceluloză.

Prepararea cu grijă a fosfocelulozei este esențială pentru succesul acestei metode de purificare. 125 g de fosfoceluloză Whatman *P-11* s-au suspendat în 4 l de HCl 0,2 M diluat cu alcool etilic 95% și s-au amestecat cu grijă 30 min la temperatura camerei. Suspensia a fost lăsată să se liniștească, iar supernatantul s-a aspirat sau s-a decantat pentru îndepărtarea particulelor prea fine. Rășina s-a filtrat la vid și s-a spălat de 2—3 ori prin suspendare în 4 l apă distilată. *p*H-ul s-a ajustat la 7 cu NaOH 1 M, rășina s-a

Tabelul 21

Testarea activității endonucleazelor restrictive eluate de pe fosfoceluloză

Enzima	Sonicare		Testare				
	Lizozim	Timp total	Tampon[a]	Centri rupere în substrat[b]	Extract brut[c]	Eluat de pe fosfoceluloză	Timp
Alu I	100 µg/ml 30′	4′	666	10	—	2 µl	30′
Bam I	100 µg/ml 30′	12′	TM	1	—		
Bgl I	100 µg/ml 15′	3′	666	1	—	2 µl	60′
Bgl II	100 µg/ml 15′	3′	666	λ DNA 5	—		
Eco *R*I	—	4′	TM + 0,1 M NaCl	1	0,05µl	0,05 µl	10′
Eco *R*II	—	4′	TM	5	2 µl	2 µl	30′
Hae II	—	4′	666	2	—	1 µl	30′
Hae III	—	4′	666	*pMB8*> 12	—	1 µl	30′
Hga	—	4′	666	*pKB252* 5	8 µl	4 µl	20′
Hinc II	—	4′	666 + 0,05 M NaCl	2	—	—	—
Hpa I	—	4′	666 + 0,05 M NaCl	*pMB9*> 10	—	2 µl	15′
Hpa II	—	4′	666 + 0,05 M NaCl	*pMB9*> 10	—	2 µl	15′
Hsu	—	4′	666 + 0,05 M NaCl	1	—	1 µl	15′
Pst	100 µg/ml 15′	2′	TM	1	—	2 µl	30′
Sal I	—	5′	666 + 0,15 M NaCl	1	—	1 µl	60′
Taq	—	5′	666	*pBR345* 1	—	—	—

a) TM = Tris 0,1 M—HCl *p*H = 7,5 cu $MgCl_2$ 5 mM;
666 = Tris 6 mM—HCl *p*H = 7,5 cu $MgCl_2$ 6 mM, β-mercaptoetanol 6 mM

b) substrat DNA *pBR322*, cu excepțiile specifice

c) ajustarea mai exactă a cantității de extract, precum și a timpului de incubare ar putea face vizibil aspectul enzimatic al acestor endonucleaze specifice.

suspendat în 4 l NaOH 0,1 M, s-a amestecat 30 min la temperatura camerei, s-a colectat prin filtrare și s-a resuspendat în 4 l de EDTA 1 mM. S-a agitat din nou timp de 30 min la temperatura camerei și s-a spălat de 3 ori cu apă distilată. *p*H-ul s-a reajustat la 7 cu HCl 1 M, iar apoi rășina s-a suspendat în tampon EB cu NaCl 0,2 M. (*p*H-ul s-a reajustat înainte de trecerea în coloană, deoarece este mai simplu în acest mod; în coloană ar fi necesare numeroase volume de tampon pentru echilibrare). 125 g de fosfoceluloză pudră dau o umplutură de cca 500 ml. Dacă rășina inițială este impură (loturile de fosfoceluloză variază mult între ele), volumul sau numărul spălărilor cu HCl alcool etilic și NaOH va fi mărit. Particulele fine se vor îndepărta lăsînd rășina să se așeze prin aspirare sau decantare. Agitarea rășinii se va face ușor, pentru a nu produce apariția de particule fine; rășina nu va fi lăsată mai mult de două ore la valorile extreme de *p*H.

O coloană de 150–200 ml (2,5–35 cm) este suficientă pentru 50 g celule. Înainte de impachetare se va spăla cu cîteva volume de EB cu NaCl (tabelul 21). Extractul se încarcă direct în coloană, iar coloana se spală cu cîteva volume de EB cu NaCl pînă cînd E_{280} scade aproape de 0. Coloana se eluează cu un gradient liniar de NaCl în tamponul de extracție (1–1,5 1; ~ 7 ori volumul coloanei). Concentrațiile individuale de NaCl pentru eluția enzimei sînt date în tabelul 21. S-au colectat fracțiuni de cîte 10 ml, care s-au testat din punct de vedere al activității endonucleazice. Fracțiunile corespunzătoare picului de activitate s-au reunit și s-au supus cromatografiei pe hidroxiapatită.

e) Cromatografia pe hidroxiapatită.

S-a împachetat o coloană de 20 ml de hidroxiapatită (Clason chemical Co.) și s-a echilibrat cu EB cu NaCl 0,2 M. Fracțiunile active reunite de pe fosfoceluloză s-au aplicat direct pe coloană, iar coloana s-a spălat cu cca 100 ml de EB cu EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 7 mM, NaN_3 1 mM și NaCl 0,2 *p*H = 7. Tabelul 22 prezintă concen-

Tabelul 22

Concentrațiile saline de eluție cromatografică a endonucleazelor restrictive

Enzima	Cromatografie pe fosfoceluloză — Molaritate NaCl			Cromatografie pe hidroxiapatită — Molaritate $K_2HPO_4 \cdot KH_2PO_4$		Randament 50g unit[b]/celule	Utilizată pentru determinarea de secvențe
	Încărcare coloană	Gradient	Eluție enzimă	Gradient	Eluție enzimă[a]		
Alu I	0,2	0,2–1,0	0,35	0,01–0,25	0,10	4 000	—
Bam I	0,2	0,2–0,6	0,35	0,01–0,25	0,08	60 000	—
Bgl I	0,2	0,2–0,8	0,30	0,01–0,50	0,30	—	NT[c]
Bgl II	0,2	0,2–0,8	0,50	0,01–0,40	0,27	—	NT
Eco *R*I	0,2	0,2–0,8	0,60	0,01–0,50	0,20	1 000 000	—
Eco *R*II	0,2	0,2–0,6	0,40	0,01–0,25	0,04	15 000	—
Hae II }	0,2	0,2–1,0	0,40	0,01–0,50	0,25	60 000	—
Hae III }			0,90	0,01–0,50	0,25	180 000	—
Hga	0,2	0,2–1,0	0,40	—	—	6 000	NT
Hin*c* III	0,1	0,1–0,6	0,35	0,01–0,25	0,06	—	NT
Hpa I	0,2	0,2–1,0	0,45	0,01–0,50	0,30	500	NT
Hpa II	0,2	0,2–1,0	0,30	0,01–0,50	0,20	25 000	NT
Hsu I	0,2	0,2–0,0	0,30	0,01–0,25	—	60 000	—
Pst I	0,2	0,2–0,6	0,35	0,01–0,40	0,20	30 000	NT
Sal I	0,2	0,2–0,8	0,40	—	—	25 000	NT
Taq	0,2	0,2–0,8	0,40	0,01–0,25	0,12	8 000	—

[a] Concentrații de eluție aproximative.

[b] Unitate — cantitatea de enzimă necesară pentru a hidroliza complet 1 μg DNA în decurs de o oră la 37°C (sau 60°C pentru Taq). Cantități minime estimate.

[c] NT — netestat.

trațiile de fosfat de potasiu pentru fiecare enzimă în parte. S-au colectat fracțiuni de 4 ml, care s-au testat din punct de vedere enzimatic. Fracțiunile corespunzătoare picurilor s-au unificat și s-au dializat contra tamponului de păstrare ($K_2HPO_4 \cdot KH_2PO_4$ 20 mM, $pH = 7$, NaCl 0,2 M, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 7 mM, NaN_3 1 mM diluat 1:1 cu glicerol). Această dializă concentrează enzima de cca 3 ori. În acest tampon enzimele sînt stabile mai multe luni la −20°C. Preparate enzimatice mult mai concentrate se obțin prin dializa fracțiunilor de pe hidroxiapatită contra PEG-6000 solid, anterior dializei contra tamponului de păstrare.

Trei enzime — Sal I, Eco*R*II, Hga I — nu se leagă bine la hidroxiapatită: cca 70% din Eco *R*I, 90% din Hga I și tot Sal I (ca activitate) se regăsesc în lichidele care curg prin coloană. În cazul Eco *R*II și Sal I se leagă de coloană cea mai mare parte a activităților contaminante, ceea ce constituie totuși un grad de purificare.

f) Cromatografia pe Biorex 70.

După cromatografia pe fosfoceluloză și hidroxiapatită, Hga I conține în continuare o mare cantitate de contaminanți (exonucleaze). Ceea ce a curs de pe coloana de hidroxiapatită s-a concentrat, dializat contra EB și s-a purificat în continuare prin cromatografie pe Biorex 70 (Biorad).

Coloana cu o umplutură de 20 ml s-a echilibrat cu EB, iar fracțiunea purificată de pe hidroxiapatită se aplică integral. Coloana s-a spălat cu EB și s-a developat cu un gradient de 0—0,5 M NaCl în EB. Cea mai mare parte a exonucleazei a fost prezentă în ceea ce a curs, în timp ce Hga eluează la cca 0,3 M NaCl. Cromatografiei pe Biorex i s-a supus și Eco *R*II și Hpa II. Ca și în cazul Hga, exonucleazele au apărut in „void-volum", iar endonucleazele de restricție au eluat la 0,3—0,4 M NaCl.

Cromatografia pe Biorex 70 se poate aplica tuturor restrictazelor.

g) Discuție.

Procedeul prezentat constituie simplificarea unui procedeu publicat anterior pentru Eco *R*I. Toate enzimele se leagă la fosfoceluloză la concentrații de NaCl suficient de mari pentru a disocia enzima de DNA în extractele brute. Aceasta permite adăugarea directă a extractului brut pe fosfoceluloză; acizii nucleici nu se leagă la coloană și se spală. Streptomicina și $(NH_4)_2SO_4$ ca agenți precipitanți sînt evitați, iar etapele de dializă reduse, ceea ce are ca urmare scurtarea procedeului de purificare și un randament crescut de extracție.

Digestia DNA duce la apariția unor fragmente clare în gel; acestea pot servi ca substrat pentru DNA-ligază, ceea ce duce la reformarea situsurilor de rupere.

Metoda de purificare și testare a ligazei T4 necesară construirii de molecule de DNA recombinant (după Moore și James, 1976)

Principiul metodei se bazează pe faptul că cea mai mare parte a activității exonucleazice din extractele brute de *E. coli B* eluează de pe fosfoceluloză la concentrații saline mici (0,25 M KCl), în timp ce ligaza eluează în domeniul 0,30—0,36 M KCl; aceasta permite testarea activității ligazice de la bun început.

Materiale și metode

Bacterii: *E. coli RY-13* (*E. coli B* avînd factorul 1 de transfer al rezistenței la antibiotice); *E. coli JC411thy⁻(Col E₁)* pentru factorul colicin E_1; *E. coli* lizogen *λcI857sus S7*.

Enzime: Eco *R*I preparată prin cromatografie pe fosfoceluloză, hidroxiapatită, DEAE-celuloză.

Bacteriofagul *T4* se crește după metoda descrisă de Thomas și Abelson (1966). Celulele sînt cultivate și infectate după metoda preconizată de Weiss și colab. (1967).

Cultura bacteriană se recoltează prin trecerea ei rapidă prin serpentine de oțel inoxidabil răcite în baie de gheață, urmată de centrifugarea 7 min la 6 000 xg. Celulele se păstrează la −70°C. Toate operațiile următoare au loc la 4°C și toate tampoanele conțin β-mercaptoetanol 7 mM (dacă nu se dau alte indicații).

Celulele înghețate (65 g) se suspendă în 450 ml tampon A (Tris 10 mM − HCl *p*H 7,6 cu glutation 1 mM în loc de β-mercaptoetanol) și se sparg prin ultrasonicare 10 min (20 de șocuri a 30 s) cu ultrasonicator Branson model W 185 la puterea maximă. Resturile celulare se îndepărtează prin ultracentrifugare 60 min la 100 000xg. Acizii nucleici înalt polimerizați se îndepărtează prin precipitare cu sulfat de streptomicină. Pentru completarea precipitării acizilor nucleici, supernatantul obținut prin centrifugarea preparatului anterior, se tratează din nou cu sulfat de streptomicină. Apoi se adaugă $(NH_4)_2SO_4$ solid pînă la saturare 50%, cu agitare 30 min. După centrifugare la 15 000xg timp de 20 min, sedimentul rezultat se dizolvă în 100 ml tampon A și se dializează 18 ore contra 3×1 l tampon fosfat potasic 0,010 M cu KCl 0,1 M *p*H 7,6 (tampon B). Noul preparat se aplică pe o coloană de fosfoceluloză Whatman *P-11* 2,5×50 cm, echilibrată cu tampon B. Coloana se spală cu 1 l tampon B, iar apoi se aplică un gradient liniar (volum total = 2 *l*) de 0,1 − 0,8 MKCl în tampon fosfat potasic 0,010 M *p*H 7,6. Fracțiunile active (1000 unit/ml) și care eluează în zona 0,3−0,36 M KCl se unifică, se dializează 18 ore contra 3 × 2 l tampon Tris 0,15 M−HCl *p*H 7,6 cu KCl 0,05 M (tampon C). Preparatul se aplică pe o coloană de DEAE-celuloză Whatman *DE*-52 2,5 × 50 cm, echilibrată cu tampon C, se spală cu 1 l tampon C și se eluează cu un gradient liniar (volum total = 2 l) de 0,05−0,30 M KCl în tampon Tris 0,015 M−HCl *p*H 7,6. Fracțiunea activă − 0,12−0,15 M KCl − se concentrează prin dializă contra tamponului C cu 50% glicerol și se păstrează la −20°C.

Prepararea DNA substrat

Fragmentele de DNA obținute în urma hidrolizei DNA cu Eco *R*I se extrag odată cu fenol saturat cu EDTA · Na_2 10 mM *p*H 8,0 și se dializează exhaustiv contra tampon Tris 10 mM−HCl *p*H 7,6. Pentru a produce legarea fragmentelor **1** și **6** de DNA prin mijlocirea punților de hidrogen dintre capetele coezive ale acestora, alicote din hidrolizat se aduc la $MgCl_2$ 10 mM, se incubează la 50°C timp de 3 ore și se lasă să se răcească încet. Prezența Mg^{2+} permite formarea rapidă a legăturilor de hidrogen la capetele coezive, fără a mai reclama concentrații ridicate de Na^+.

Testarea activității ligazice

Se urmărește conversia legăturii de hidrogen dintre fragmentele **1** și **6** ale hidrolizatului de DNA cu Eco *R*I la o legătură covalentă (tip CCI), cu formare de DNA nedenaturabil termic. Amestecul de reacție standard conține într-un volum de 25 μl: 2,5 μg fragmente de DNA λ, Tris 50 mM−HCl *p*H 7,6, DTT 10 mM, ATP 0,07 mM și cantități variabile de enzimă, diluată în tampon Tris 50 mM-HCl *p*H 7,6 cu 500 μg/ml albumină bovină. Amestecul se incubează 30 min la 37°C. Reacția se stopează prin adăugare de EDTA Na_2 5 mM *p*H 8,0. Amestecul se încălzește 10 min la 65°C, iar apoi se răcește brusc la 0°C pentru a desface toate legăturile, în afara celor covalente. Se adaugă sucroză și albastru de bromfenol în concentrații de 10% și, respectiv 0,02% (g/v). Probele astfel pregătite se supun electroforezei pe geluri de agaroză de 10 cm lungime și 0,8% concentrație. În acest caz, unitatea de activitate enzimatică o reprezintă acea cantitate de ligază care leagă covalent capetele coezive dintr-un 1 μg de DNA (3,9 × × 10^{10} capete) în condiții standard. Aceasta corespunde cu dispariția benzii **6** din gel.

Transformarea celulelor de E. coli K12 cu DNA plasmidic (după Berg și colab., 1976)

Pentru transformarea celulelor de *E. coli* cu DNA plasmidic, autorii au adaptat astfel procedeul clasic al lui Mandel și Higa (1970):

Celulele bacteriene competente se cresc la 37°C în mediu L pînă cînd densitatea mediului atinge valoarea $E_{600} = 0,3-0,6$. Cultura se răcește la 0°C pe baie de gheață, iar celulele se sedimentează și se resuspendă la rece în 0,5 volume de $CaCl_2$ 0,1 M. Se centrifughează din nou, iar sedimentul se resuspendă în 0,1 volume $CaCl_2$ 0,1 M. Apoi, probele de 0,1 ml DNA plasmidic reluat în tampon TEN (Tris 0,02 M; EDTA 0,001 M; NaCl 0,02 M; *p*H 8,0), răcite la 0°C se adaugă la 0,2 ml celule competente răcite pe baie de gheață. În scopul creșterii frecvenței de transformare, probele s-au încălzit 30 s. la 37°C, imediat după amestecare.

De menționat că, pentru a facilita captarea DNA plasmidic în celulele competente, alți autori, de exemplu Lederberg și Cohen (1974) recomandă ca amestecul de reacție să fie incubat inițial 30 min la 0°C și apoi să se încălzească 2 min la 42°C.

După transformare, celulele tratate se incubează la 37°C timp de 60—90 min, în mediu cu 10% glicerol și antibioticul adecvat (tetraciclină 2 μg/ml, în cazul special al plasmidei studiate de autori). Apoi se face clonarea pe plăci cu agar nutritiv și antibiotic, de exemplu tetraciclină 25 μg/ml.

Metoda generală de construire a unor DNA recombinanți (după Clarke și Carbon, 1975)

Plasmidele hibride au fost construite *in vitro* folosind pentru legare poli(dA · dT) prin metoda descrisă de Lobban și Kaiser (1973) și Jackson și colab. (1972).

Endonucleaza restrictivă Eco *R*I, exonucleaza λ, deoxinucleotidiltransferaza terminală din timusul de vițel se prepară conform metodelor specifice.

Col E_1 CCI DNA sau DNA de *E. coli* se hidrolizează total cu enzima restrictivă Eco *R*I într-un amestec de reacție care conține Tris 10 mM—HCl *p*H 7,5 cu NaCl 50 mM, $MgCl_2$ 5 mM, gelatină 100 μg/ml și DNA 100 μg/ml. Reacția durează 30 min la 37°C, apoi amestecul se răcește brusc la 0°C pe baie de gheață. Amestecului de reacție i se adaugă o jumătate de volum de soluție glicină 200 mM-KOH *p*H 9,4 cu $MgCl_2$ 12 mM, conținînd 400 unități de exonuclează λ/ml și se lasă încă 30 min pe gheață. Pentru stoparea reacției se adaugă EDTA Na 10 mM, după care DNA se extrage cu fenol și se precipită cu alcool etilic. Anterior s-a determinat că tratamentul cu exonuclează λ îndepărtează cca 25 nucleotide de la capătul 5′-fosfat al DNA. Acest tratament înlesnește reacția următoare, a transferazei terminale.

La capetele 3′-hidroxil se adaugă extensii poli(dA) și poli(dT) în modul descris anterior. Extensiile poli(dT) se leagă la DNA *Col E_1*; amestecul de reacție conține cacodilat de potasiu 100 mM *p*H 7,0, $MgCl_2$ 8 mM, β-mercaptoetanol 4 mM, KH_2PO_4 7,5 mM, $CoCl_2$ 0,5 mM, BSA 150 μg/ml, [^{3}H] dTTP 0,1 mM, DNA 100 μg/ml și transferază terminală 55 μg/ml. Amestecul de reacție se incubează 25 min la 37°C și se stopează prin adăugare de EDTA · Na 10 mM. DNA *Col E_1* cu extensie politimidilată se extrage cu fenol și se precipită cu alcool etilic. În condițiile prezentate per moleculă de DNA se atașează aproximativ 300 rezidii dT sau 150 rezidii dT per catenă. Extensiile poli(dA) se atașează la DNA *E. coli*, într-un amestec de reacție similar cu anterior, dar din care se omite $CoCl_2$ și folosind [^{3}H] dATP 0,1 mM, DNA *E. coli* 100 μg/ml, transferază terminală 180 μg/ml. Reacția durează 45 min la 37°C și se stopează prin adăugare de EDTA · Na 10 mM. DNA *E. coli* cu extensie poliadenilică se extrage cu fenol și se precipită cu alcool etilic. Per moleculă de DNA se introduc astfel aproximativ 300 resturi dA sau 150 rezidii dA per catenă, considerînd că genomul de *E. coli* ($2,7 \times 10^9$D) este tăiat în aproximativ 400 fragmente de Eco *R*I (masa moleculară a fragmentelor aproximativ $6,3 \times 10^6$D).

Se amestecă cantități egale de DNA *Col* $E_1-(dT)_{150}$ și DNA *E. coli*-$(dA)_{150}$ (5 µg/ml) în tampon Tris 10 mM—HCl *p*H 8,0 cu NaCl 100 mM, EDTA.Na 1 mM și se lasă să se „ordoneze" timp de 1 oră la 46°C, 1 oră la 37°C, 1 oră la 23°C sau 16 ore la 37°C. Preparatele ordonate de DNA se concentrează prin precipitare cu alcool etilic și se păstrează la 4°C în tampon Tris 10 mM—HCl *p*H 8,0 cu NaCl 10 mM, EDTA. Na_2 1mM.

Un avantaj al metodei cu „conectori" poli(dA · dT) este acela că evită folosirea ligazei pentru obținerea DNA circular. Preparatele de DNA nelegate sînt infectante și sînt convertite la forma *CCI* DNA *in vivo*.

Metoda de construire a unui DNA recombinant conținînd gena pentru sinteza somatostatinei după Itakura și colab. (1977)

Ca plasmidă parentală se folosește plasmida *pBR322*. 5 µg DNA plasmidic se hidrolizează cu Eco *RI*. Reacția se stopează prin extracție cu un amestec de fenol și cloroform, iar DNA se precipită cu alcool etilic și, apoi se reia în 50 µl de tampon pentru DNA polimeraza *T4*. Reacția se inițiază prin adăugarea a 2 unități de DNA polimerază *T4* și decurge timp de 30 min la 37°C. Stoparea reacției se face și de această dată prin extracție cu fenol și cloroform, urmată de precipitarea cu etanol. 3 µg DNA *plac5* se hidrolizează cu Hae III. Printr-o reacție ligazică între fragmente cu capete netede, se face unirea DNA *pBR322* hidrolizat ca mai sus cu DNA *plac5*; reacția a decurs într-un volum de 30 µl, folosind *T4* ligază eluată de pe hidroxiapatită, în tampon Tris 20 mM—HCl *p*H 7,6 cu $MgCl_2$ 10 mM, ditiotreitol 10 mM și ATP 0,5 mM, timp de 12 ore la 12°C. Amestecul de DNA „legat" se dializează contra tamponului Tris 10 mM — HCl *p*H 7,6 și se folosește pentru transformarea tulpinii bacteriene *E. coli* RR_1. Transformanții se selectează din punct de vedere al rezistenței la tetraciclină și ampicilină (Tc^r și Ap^r), pe mediu minimal *X-gal* (40 µg/ml) cu antibiotice (20 µg/ml).

Coloniile care sintetizează β-galactozidază se identifică prin culoarea lor albastru deschis. Se face un screening pe 45 de colonii albastru deschis; cele 3 colonii care conțin plasmide caracterizate prin prezența a două situsuri de recunoaștere pentru Eco *RI*, separate prin aproximativ 200 perechi de nucleotide. Plasmida *pBH10* se dovedește că este purtătoarea unui fragment integrat de DNA, într-o poziție convenabilă, adică operatorul *lac* se află tangent cu gena Tc^r a plasmidei. În continuare, plasmida *pBH10* se modifică în vederea eliminării situsului de recunoaștere pentru Eco *RI*, care se află în poziție distală față de operatorul *lac*. În acest mod se realizează plasmida *pBH20*, care se utilizează pentru clonarea genei sintetice a somatostatinei.

10 µg DNA plasmidic pBH20 se hidrolizează cu Eco *RI* și Bam *HI* și apoi se tratează cu 0,1 unități fosfatază alcalină bacteriană (Worthington), timp de 10 min la 65°C. Amestecurile de reacție se extrag cu fenol și cloroform, iar DNA se precipită cu etanol. 50 µl de soluție, cu 4 µg DNA specific pentru somatostatină per ml, se introduc în reacție ligazică împreună cu DNA *pBH20* (tratat în modul descris, în prezența a 4 unități DNA-ligază *T4*, timp de 2 ore la 22°C. Într-un experiment martor, făcut în paralel, *pBH20* tratat ca mai sus se introduce în reacție ligazică, în absența DNA specific pentru somatostatină. Ambele preparate, rezultate din reacția ligazică, se folosesc în continuare pentru transformarea celulelor *E. coli* RR_1. Transformanții se selecționează pe plăci cu antibiotice și mediu *X-gal* minimal. Din cei 10 transformanți Tc^s (în experimentul martor nu se obțin nici un fel de transformanți), 4 se dovedesc a conține plasmide cu centri de recunoaștere pentru Eco *RI* și Bam *HI*. Mărimea fragmentului mic de DNA, cuprins între cele două situsuri de recunoaștere pentru restrictaze, este — în fiecare din cele 4 cazuri analizate — similară cu mărimea DNA specific pentru somatostatină, preparat *in vitro*. Analiza secvenței bazelor arată că noua plasmidă obținută *pSOMI* conține inserat DNA specific pentru somatostatină. Deoarece nu s-a reușit detectarea activității hormonale a somatostatinei din culturile bacteriene cu plasmidă *pSOMI*, s-a construit o nouă plasmidă, în care gena pentru somatostatină este localizată a capătul —COOH al genei pentru β-galactozidază. În acest scop, 50 µg DNA *pSOMI*

se hidrolizează cu Eco *RI* și Pst I. Pentru izolarea celui mai mare fragment Eco *RI* — Pst I, care poartă gena pentru somatostatină, de fragmentul mic de DNA, care poartă controlul *lac*, se folosește un gel preparativ de poliacrilamidă (5%). În același mod s-a procedat și pentru plasmida *pBR322*: 50 μg DNA se hidrolizează cu Eco *RI* și Pst I, iar fragmentul cel mai mic de *pBR322* rezultat se purifică electroforetic. 1 μg din acest fragment mic intră în reacție ligazică cu 5 μg din fragmentul mare de *pSOMI*. DNA „legat" obținut se folosește pentru transformarea *E. coli* RR_1. Transformanții au fost selecționați pentru rezistența la ampicilină (Ap^r) pe mediu *X-gal*. Aproximativ 95% din transformanți dau colonii albe pe plăci cu indicator *X*-gal, arătînd lipsa operatorului *lac*. Plasmida rezultată — *pSOMII* — se folosește pentru construirea plasmidei *pSOM*III. 5 μg DNA *pSOM*II și 5 μg *plac* DNA se hidrolizează cu Eco *RI*. DNA se extrage cu fenol și cu cloroform, iar DNA se precipită cu etanol. Precipitatul rezultat se resuspendă în 50 μl tampon pentru *T4* DNA ligază, la care se adaugă 1 unitate de ligază. Noul DNA, obținut în urma reacției ligazice, se folosește pentru transformarea celulelor de *E. coli* RR_1. Transformanții se selectează pentru rezistența la ampicilină (Ap^r) pe plăci cu indicator *X-gal* cu ampicilină, iar apoi se face screening-ul pentru detectarea producției genei β-galactozidazei inserate. Aproximativ 2% din colonii sînt albastru deschis (ca și pentru *pSOM*I și *pSOM*I-2). Analiza cu endonucleaze restrictive a DNA plasmidic obținut din aceste clone a arătat că toate plasmidele conțin un nou fragment Eco *RI* de aproximativ 4,4 Mdal, care poartă genele pentru operatorul *lac* și cea mai mare parte a genei pentru β-galactozidază. Fragmentul Eco *RI* poate avea două orientări, iar localizarea simetrică a activității restrictive Hin*d* III pe acest fragment ar putea arăta plasmida în care se realizează gena de interes, anume a genei pentru somatostatină.

Bibliografie

1. Bazaral, M., Helinski, D.R., *J. Mol. Biol.*, **36**, 185 (1968).
2. Berg, P. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., **76**, 697 (1976).
3. Colman, A., Byers, M., Primrosi, S.B., Lyons, A., *Eur. J. Biochem.*, **91**, 303 (1978).
4. Clarke, L., Carbon, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **72**, 4361 (1975).
5. Clewell, D.B., Helinski, D.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, **62**, 1159 (1969).
6. Eckhardt, T., *Plasmid*, **1**, 584 (1978).
7. Greene, P.J., Heyneker, H.L., Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Betlach, M.C., Covarrubias, A.A., Backman, K., Russel, D., Tait, R., Boyer, H.W., *Nucleic Acids Res.*, **5**, 2373 (1978).
8. Guerry, P., LeBlanc, D.J., Falkow, S., *J. Bacteriol*, **116**, 1064 (1973).
9. Horiuchi, T., Ohshima, Y., *J. Mol. Biol.*, **20**, 512 (1966).
10. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A.D., Heyneker, H.L. Bolivar, F., Boyer, H.W., *Science*, **198**, 1056 (1977).
11. Moore, S.K., James, E., *Anal. Biochem*, **75**, 545 (1976).
12. Popa, L.M., Repanovici, R., Iliescu, R., Anghelescu, S., *Rev. Roum. Biochim*, **4**, 279 (1980).
13. Sol, C.J.A., Walig, C., Schegget, Ter, J., van der Noordaa, J.S., *J. Gen. Virol.*, **28**, 285 (1975).
14. Yoshimori, R.N., Teză de doctorat, Universitatea California (1973).

Redactor: ing. CARMEN ZGĂVÂRDICI
Tehnoredactor: MARILENA DAMASCHINOPOL

Coli de tipar: 19,50. Bun de tipar: 23.02.1982.



Tiparul executat sub comanda
nr. 669 la
Întreprinderea poligrafică
„13 Decembrie 1918",
str. Grigore Alexandrescu nr. 89-97
București,
Republica Socialistă România

Lei 22

EDITURA
ȘTIINȚIFICĂ ȘI
ENCICLOPEDICĂ

